



Universidad Autónoma  
de Madrid  
Facultad de Ciencias



# **SÍNTESIS ELECTROQUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE COBALTO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES BIOMÉDICAS**

Memoria presentada para optar al grado de  
Doctor Europeo

**EVA MAZARÍO MASIP**

Directores    Dra. Pilar Herrasti González

Dra. Nieves Menéndez González

Madrid, Junio 2015



# Resumen

---

En la presente tesis se ha desarrollado un nuevo método de síntesis electroquímica de NPs magnéticas, en concreto ferritas de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ). Las ferritas son espinelas inversas del tipo  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  donde el M puede ser Co, Ni, Fe, Mn, etc... con estado de oxidación igual a (+2), mientras que el Fe presenta estado de oxidación (+3). La estructura presenta dos tipos de posiciones, las octaédricas (B) y las tetraédricas (A). Cuando idealmente una ferrita presenta estructura 100% inversa el  $\text{M}^{2+}$  se encuentra exclusivamente en posición B, mientras que el  $\text{Fe}^{3+}$  se encontraría distribuido a partes iguales en A y B, esta disposición no es la que habitualmente presentan estas ferritas, ya que de modo general el  $\text{M}^{2+}$  también tiene presencia en las posiciones A de la estructura, aunque de manera mayoritaria se encuentra en la posición B. Por tanto, parece evidente que dependiendo de la distribución de los cationes que conforman la estructura, las propiedades magnéticas de la misma se verán modificadas.

El método electroquímico desarrollado se basa en la oxidación de las láminas de los metales que constituyen la estructura de la ferrita. Las láminas de hierro y cobalto se sumergen en una disolución acuosa que contiene un electrolito del tipo sal de amina cuaternaria ( $\text{Bu}_4\text{NBr}$ ). La liberación de iones  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  a la disolución se realiza mediante la oxidación de las láminas (ánodos), de modo que es imprescindible la presencia de un cátodo donde tenga lugar la reducción del agua para liberar iones hidroxilo, aumentando el pH de la disolución y favoreciendo termodinámicamente y cinéticamente la formación de los oxihidróxidos de Fe y Co, que finalmente acaban reduciéndose en la superficie del cátodo para dar lugar a la ferrita de cobalto. Los parámetros que controlan el proceso de síntesis electroquímico como son la agitación de la disolución, la intensidad de corriente aplicada a cada lámina, la temperatura, la posición y forma de los electrodos dentro de la celda han sido optimizados para obtener ferritas de cobalto estequiométricas y de diferentes tamaños. Este nuevo método es reproducible, y económico.

Dado que uno de los objetivos de esta tesis es el estudio de la aplicación de estas nanopartículas en biomedicina, la funcionalización de las NPs obtenidas es de vital importancia. Para esta funcionalización se ha utilizado el ácido cítrico (AC), el cual aporta numerosas ventajas. La primera de ellas es la obtención de coloides estables con carga superficial negativa, la segunda es que el medio ácido donde se realiza la funcionalización favorece la disolución de las NPs más grandes de

modo que la distribución de tamaño de éstas se hace más estrecha. Por último, gracias a este proceso, las NPs se obtienen sin impurezas y sin haberse visto alterada su relación molar de iones Fe y Co de 2.0.

Se ha llevado a cabo una exhaustiva caracterización para obtener la mayor información posible sobre la estructura cristalina y magnética del material. La exclusiva existencia de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  fue confirmada por absorción de rayos X, mientras que las ocupaciones de los iones (Fe, Co y O) dentro de la red fueron determinadas mediante difracción de neutrones, al igual que la inversión de la estructura y la temperatura de Néel. Estos dos últimos resultados fueron corroborados también mediante Espectroscopia Mössbauer. El orden de inversión de la estructura de los materiales sintetizados fue del orden del  $\gamma = 0.72$  y la temperatura de Néel se estimó entre 800-860 K.

El estudio de la capacidad que presentan las NPs de ferrita de cobalto sintetizadas electroquímicamente para ser utilizadas en aplicaciones biomédicas como, resonancia magnética de imagen e hipertermia magnética han sido dos de los objetivos a desarrollar en la presente tesis. Previo a dicho estudio la ferrita de cobalto se funcionalizó con una molécula de vectorización, como es el ácido fólico (AF) o vitamina B, para demostrar la especificidad que presenta esta cubierta orgánica hacia determinadas líneas celulares que sobreexpresan receptores de folato en su superficie, como las células HeLa. Para ello se ha comparado la internalización de las NPs recubiertas con cítrico y las recubiertas con fólico incubadas durante 24 h en células HeLa. Tras este proceso se ha cuantificado la cantidad de Fe existente en cada muestra, siendo 4 veces superior la cantidad de Fe en las células con NPs con AF respecto a las células con NPs con AC.

Para llevar a cabo el estudio de resonancia magnética de imagen se cuantificó la relajatividad de los coloides formados por NPs recubiertas con AF y con cubierta de AC, obteniéndose en ambos casos un valor de  $r_2$  muy superior a los típicos de los ferrofluidos comerciales. Además se realizaron estudios de RMI *in vitro* para demostrar la especificidad de las NPs con cubierta de AF hacia células HeLa, comparando las imágenes de resonancia magnética obtenidas con la línea celular HeLa y la línea A549, que no sobreexpresa receptores de folatos, incubadas ambas el mismo tiempo y con la misma cantidad de NPs. Las imágenes obtenidas para estas dos muestras demostraron cualitativamente un mayor contraste de imagen medido sobre células HeLa que sobre células A549, demostrando de nuevo una mayor tasa de internalización con la combinación células HeLa y recubrimiento AF.

Se realizaron medidas de citotoxicidad de las NPs con diferentes concentraciones de coloide y tiempos de incubación, además se estudiaron los posibles efectos citotóxicos en coloides con diferente tamaño hidrodinámico, con distinta cubierta (AF o AC) y con diferentes líneas celulares. En



ningún caso las NPs provocaron muerte celular considerable, incluso la tinción del citoesqueleto corroboró la escasa o nula citotoxicidad de las NPs.

Finalmente se realizaron medidas de hipertermia con NPs recubiertas con AC, bajo la acción de diferentes campos magnéticos alternos. La ferrita de cobalto, muestra modestos valores de SAR. Se ha llevado a cabo un estudio teórico para explicar este resultado comprobando que el mecanismo de relajación a través del cual estos coloides relajan, es predominantemente browniano. Estas conclusiones teóricas se demostraron mediante experimentos de hipertermia con NPs embebidas en agar donde el calentamiento resultó ser nulo, hecho que demuestra que la fricción con el medio de las NPs es el mecanismo responsable de la disipación de calor.







# Summary

---

During the development of this thesis, several objectives have been proposed and achieved. First, a new synthesis method has been developed to synthesize ferrites nanoparticles ( $MFe_2O_4$ ) where M is  $Co^{2+}$  and iron atoms are  $Fe^{3+}$ . Typically, this spinel ferrite has a face-center cubic (fcc) structure in which the oxygen atoms are cubic close-packed. The structure contains two interstitial sites, occupied by metal cations, with tetrahedral A, and octahedral B sites. In general, the cationic distribution in octahedral and tetrahedral sites can be quantified by the inversion degree, which can be defined as the fraction of divalent ions in the octahedral sites.

The electrochemical synthesis method for cobalt ferrites was based on previous work developed a few years ago in our group to synthesize magnetite nanoparticles ( $Fe_3O_4$ ) [1]. This methodology is based on the electrochemical oxidation of iron and cobalt metal foils immersed in an aqueous surfactant solution. The electrochemical oxidation is produced by the application of a constant current in each metal foil or anode. Another foil of iron is required as a cathode, where the water is reduced to hydroxyl ions, whereby it enhances the pH of the solution. At this pH the iron three ions and cobalt two ions obtained during the anode oxidation react with the hydroxyl ions to form iron and cobalt oxyhydroxides, which finally are reduced in the cathode in order to obtain the cobalt ferrite nanoparticles.

The electrochemical synthesis is influenced by several factors, such as the current applied to cobalt and iron metal foils, the magnetic stirring of the solution, the reaction temperature and the disposition of each anode and cathode in the vessel, in terms of, the separation between anodes and the area and position of the cathode. All these parameters have been analyzed and tuned in order to obtain stoichiometric cobalt ferrite nanoparticles of three different sizes.

The magnitude of the current applied to iron and cobalt metal foils are directly related to the quantity of  $Fe^{3+}$  and  $Co^{2+}$  liberated through the surfactant solution, and with the ratio of  $[Fe]/[Co]$  obtained. The magnetic stirring should be high enough to facilitate the movement of the iron cobalt oxyhydroxides to the cathode, where it will be reduced to obtain cobalt ferrite. The position of the Co and Fe anodes should be placed opposite to each other and separated at a distance of 0.9 cm. A bigger distance between anodes promotes the formation of a mixture of products. The cathode should be placed around the anodes, to facilitate the reduction of the intermediate products. The

effect of the temperature in the electrochemical synthesis is related to the size of the nanoparticles, because the higher the temperature reaction the bigger the size of the obtained nanoparticles.

The effect related to the variation of each of these parameters on the product obtained has been studied separately. So, we have optimized the electrochemical method to obtain stoichiometric cobalt ferrite nanoparticles. This method is easy and reproducible. The product obtained with the appropriate parameters can be stoichiometric, monodispersed in terms of size and the main property of this new method is that the product is directly obtained in water, therefore, the phase change between organic solvent and water is not required.

Once the stoichiometric cobalt ferrite with different sizes was obtained, the next objective was to coat these nanoparticles with a biocompatible shell. First, we have changed the surfactant used for the synthesis by citric acid, to obtain a stable suspension with improved colloidal properties compared to the surfactant used during the synthesis process. This means, a high negative surface charge and narrow hydrodynamic size, which should be below 100 nm. The stabilization with citric acid is a good strategy to clean the product and avoid the mixture of phases. In addition the NPs surrounded by citric acid have a narrower distribution than the former, the molar ratio  $[Fe]/[Co]$  remains constant to two after this process.

The structural and magnetic characterizations were carried out by means of common techniques such as, DSC, TGA, XRD, TEM, FTIR and TXRF. Using more specific techniques such as Mossbauer spectroscopy, neutron diffraction (ND) and XANES the crystalline and magnetic structures of the samples have been studied. By means of absorption of X-rays in XANES region of the spectrum, the exclusive presence of  $Fe^{3+}$  and  $Co^{2+}$  cations in the cobalt ferrite structure was confirmed. The Mössbauer spectra of ferrites in large applied fields allow a more reliable distinction between A and B site components than the zero field spectra, because the applied field is usually added to the hyperfine field of one site and subtracted from the other. Therefore, there is less overlap between the two components in the high field spectra. The refinement of the in-field spectrum fitting allows us to attribute clearly the two magnetic components to the  $Fe^{3+}$  in tetrahedral and octahedral sites. So, the cation distribution obtained was  $(Co_{0.27}Fe_{0.73})[Co_{0.36}Fe_{0.64}]_2O_4$ .

It should be emphasized that the inversion degree obtained by in-field Mossbauer investigation is in good agreement with the estimated from ND analysis, where it is possible to obtain the occupancies of the  $Fe^{3+}$  and  $Co^{2+}$  in A and B sites due to the marked difference in nuclear scattering amplitude between cobalt and iron ions. On the other hand the ND technic has been performed to confirm that the structure does not have oxygen vacancies. Finally, the Neel temperature ( $T_N$ ), typical of ferrimagnetic materials was localized in 875 K by Mössbauer spectrum

and in 800 K with neutron diffractogram. Both values are very similar and close to the *bulk* value of cobalt ferrite. The saturation magnetization ( $M_s$ ) and coercitivity values obtained from the magnetic characterization measurements reveal that the nanoparticles are adequate to be used in biomedical applications, in particular in cancer therapies as hyperthermia and in diagnosis as contrast agents.

The internalization into the tumour cells has been investigated by *in vitro* experiments. In order to obtain an improved internalization of the NPs into the cells, another coating strategy was used. It consists of functionalizing the nanoparticles surface by an active target monomer, such as folic acid. The folic acid is a molecule with high affinity for folate receptors that are overexpressed on the surface of many human cancer cells, (like HeLa cells). It has been proposed that the folate-receptor makes for a suitable targeting agent because of its relatively low expression level in healthy tissues and overexpression in cancerous tissues. To investigate the efficiency of nanoparticle vectorization with folic acid, a comparison between the NPs functionalized with FA and CA was done. Same concentrations of these colloids were introduced into HeLa culture cells and after 24 h of internalization the quantity of Fe inside each cell was measured. More iron has been obtained in the FA coated cobalt ferrite nanoparticles, proving a higher rate of internalization. The cytotoxicity (MTT methodology) of both samples were also measured to confirm that there are not any toxic effects, unless at the concentrations, time of exposure and different cell lines used in this thesis.

Finally, we have investigated a biomedical application of this NPs. Due to the magnetic character of the nanoparticles synthesized, they could be used as a contrast agent in magnetic resonance imaging and in magnetic fluid hyperthermia generated by the application of an alternate magnetic field. Good transverse relaxation ( $r_2$ ) values were obtained in colloidal samples functionalized with FA, higher than typical commercial contrast agents based on iron oxide nanoparticles. However, modest values of specific absorption rates in hyperthermia measurements were obtained with cobalt ferrite nanoparticles due to their high anisotropy constant. The predominant relaxation process present in these samples is the brownian relaxation. This process involves the rotation of the nanoparticles inside the carrier liquid, so, these nanoparticles are not useful inside the tumour cells.

[1] Cabrera, L.;Gutierrez, S.;Menendez, N.;Morales, M. P.; Herrasti, P. Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochimica Acta*. 2008, 53, 3436-3441.







# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN



# Índice

1.	INTRODUCCIÓN .....	5
1.1	Ferritas: Estructura Cristalina.....	6
1.2	Ferritas y el Magnetismo .....	8
1.3	Métodos de Síntesis de Nanoferritas de Cobalto.....	12
1.3.1	Método de co-precipitación.....	13
1.3.2	Método de microemulsiones (micelas).....	14
1.3.3	Método de descomposición en medio orgánico.....	15
1.3.4	Método solvothermal.....	16
1.3.5	Método de polioles .....	17
1.3.6	Método electroquímico.....	17
1.4	NPs magnéticas: Requerimientos Tratamientos <i>in vivo</i> .....	18
1.4.1	Tamaño hidrodinámico – carga superficial – funcionalización específica.....	20
1.4.2	Las NPs en su trayecto a las células - barreras <i>in vivo</i> .....	21
1.4.3	Toxicidad .....	24
1.5	Aplicaciones Biomédicas .....	25
1.5.1	Hipertermia magnética.....	25
1.5.1.1	Mecanismos de calentamiento por hipertermia .....	28
	Dependencia del tamaño, forma, y composición en el SAR.....	33
	Dependencia de las propiedades coloidales, interacciones magnéticas y viscosidad en el SAR. ....	34
1.5.2	Resonancia magnética de imagen (RMI) .....	35
	Referencias .....	41



# 1. INTRODUCCIÓN

---

El Joint Research Centre de la Comisión Europea postuló la definición de *Nanomaterial* como, aquel material natural, fabricado o generado accidentalmente, que contiene partículas en estado aislado o aglomerado, donde al menos el 50% de ellas, en función de su distribución de tamaños (considerando el tamaño medio y la desviación estándar), presentan una o más de sus dimensiones en el intervalo de 1 -100 nm [1].

Los materiales que se encuentran en la escala nanométrica presentan una elevada relación área superficial/volumen por tanto un gran número de moléculas o átomos en su superficie, lo que le confiere unas propiedades muy diferentes al material “másico” o *bulk* y una mayor reactividad química. Estas características dan lugar a diferentes propiedades de gran interés en investigación básica y aplicada: ópticas (plasmón del oro) [2], electrónicas (*quantum dots*) [3], magnéticas (hipertermia, resonancia magnética de imagen) [4-9] o catalíticas [10].

El tamaño que presentan habitualmente las nanopartículas les hace buenas candidatas para su uso en biomedicina, ya que dichos tamaños se encuentra varios órdenes de magnitud por debajo de los tamaños de células, bacterias y virus y son de orden similar a proteínas, genes o ADN, Figura 1. La similitud de tamaños con estas biomoléculas facilita una mayor interacción. Estas propiedades han favorecido la aparición de la *nanomedicina*. En 2005, La Plataforma Tecnológica Europea ya la definía como “la aplicación de la tecnología a la salud, que explota, las propiedades físicas, químicas y biológicas mejoradas y novedosas que ofrece la escala nanométrica. Teniendo potencialmente

impacto en la prevención, en el diagnóstico prematuro y fiable y en el tratamiento de enfermedades [11].

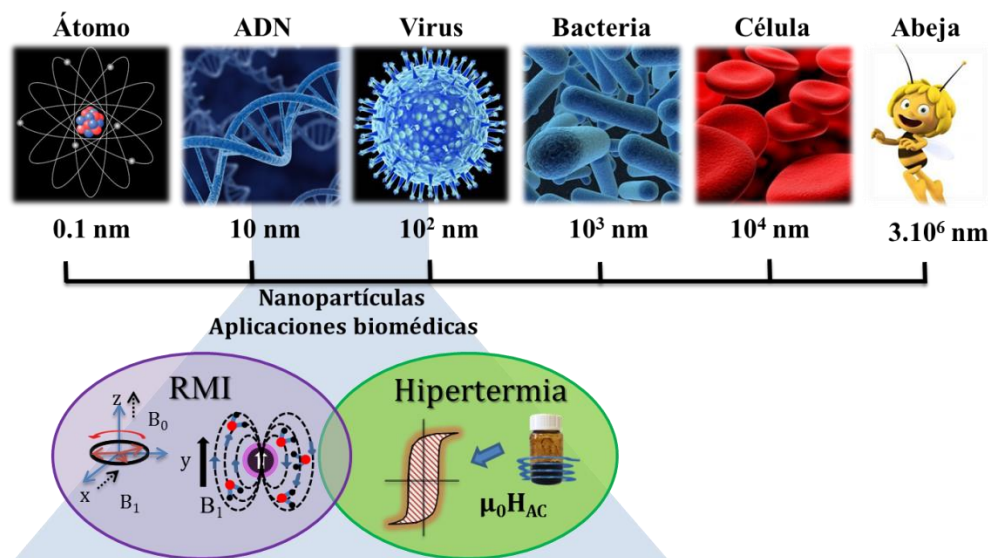


Figura 1. Escala comparativa del tamaño entre numerosos agentes biológicos y las nanopartículas. En la parte inferior, esquema de las potenciales aplicaciones biomédicas estudiadas en la presente tesis con las nanopartículas sintetizadas en la presente tesis.

De entre todos los materiales utilizados en biomedicina, los que van a centrar el estudio en la presente tesis son las nanopartículas magnéticas, las cuales pueden aportar propiedades que otros materiales no magnéticos no presentan. Estas propiedades se pueden resumir brevemente en: su capacidad de generar calor en presencia de campos magnéticos alternos externos, bien para desnaturalizar células tumorales o bien para liberar fármacos en ellas; su capacidad para transportar fármacos a zonas específicas por medio de un imán; o su utilidad como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen [12-14]. En concreto las nanopartículas (NPs) magnéticas cuya aplicabilidad se ha estudiado en este trabajo son las ferritas de cobalto (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

## 1.1 Ferritas: Estructura Cristalina

Las ferritas presentan estructura tipo espinela (AB<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) donde A y B son cationes de metales de transición. De forma general una ferrita se puede representar como MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. La estructura espinela es compleja, con 56 iones en cada celdilla unidad. Los aniones de oxígeno se encuentran estrechamente empaquetados en una disposición cúbica centrada en las caras (FCC) y los cationes ocupan el espacio entre ellos. Estos espacios son de dos tipos, uno tetraédrico (A) y otro octaédrico

(B). En la estructura espinela no todos los huecos disponibles se encuentran ocupados por cationes, solo 8 de las 64 posiciones A, y 16 de las 32 posiciones B se encuentran ocupadas [15].

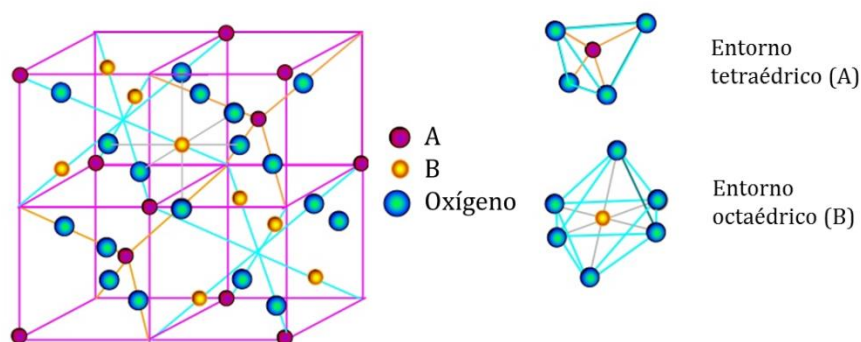


Figura 2. Estructura cristalina de una espinela y conformación de los sitios tetraédricos (A), octaédricos (B).

En concreto las espinelas se dividen en dos tipos según sus ocupaciones catiónicas. La más sencilla sería la estructura *espinela directa* con  $M^{2+}$  en los sitios A y  $M^{3+}$  en los sitios B, como ocurre por ejemplo en el caso de  $MgAl_2O_4$  [16] o  $FeCr_2O_4$  [17]. Pero existe otro tipo de ordenación más compleja en la que los cationes divalentes se encuentran en posición B, mientras que los trivalentes se encuentran distribuidos por igual entre la posición A y B, ésta se conoce como estructura *espinela inversa* y la presentan numerosas ferritas, como la de cobalto, níquel o hierro, aunque generalmente el orden de inversión no es del 100% y el  $M^{2+}$  ocupa posiciones B y A, siendo mayoritario en la B. También existen estructuras mixtas en el que el orden de inversión se encuentra claramente determinado por el método de síntesis y/o el historial térmico del material, como es el caso de la ferrita de manganeso que puede presentar estructura directa o inversa [18, 19].

Existen dos factores que determinan el tipo de inversión de las espinelas, por un lado su energía reticular ( $U_r$ ) y por otro la energía de estabilización del campo cristalino de los cationes que constituyen la espinela. De forma general el valor de  $U_r$  de las espinelas normales suele ser mayor que el de las espinelas inversas, pero en cambio dependiendo del metal de transición que se introduzca en la estructura la energía de estabilización del campo cristalino (EECC) compensa la diferencia de energía reticular entre espinelas normales e inversas. Los cationes se posicionarán dentro de la red en los sitios que tengan una energía de estabilización mayor, así los metales de transición divalentes como Ni, Co y Fe, formaran espinelas inversas por la elevada EECC de las posiciones B. Por otro lado si la diferencia energética entre A y B es pequeña o nula, el factor determinante será el valor de  $U_r$  [20].



## 1.2 Ferritas y el Magnetismo

Los materiales se pueden clasificar atendiendo a su comportamiento frente a un campo magnético externo como ferromagnéticos (FM), antiferromagnéticos, superparamagnéticos (SPM), diamagnéticos o paramagnéticos. Un material ferromagnético es aquel que presenta un momento magnético permanente en ausencia de un campo magnético externo a escala macroscópica, mientras que en un material antiferromagnético, los momentos magnéticos de átomos o iones adyacentes se encuentran alineados antiparalelamente, con lo que se anulan a escala macroscópica, por último, un material ferrimagnético presenta un momento magnético permanente al igual que los materiales ferromagnéticos pero en este caso la ordenación entre átomos o iones hace que sus momentos se anulen parcialmente.

Las ferritas más comúnmente referenciadas en la bibliografía son las de Fe, Mn, Co, y Ni, su comportamiento es ferrimagnético es decir los momentos magnéticos de los átomos en las posiciones A y B se alinean en paralelo pero formando dos subredes con dirección antiparalelas entre sí. El motivo del ordenamiento ferrimagnético, dependerá de las interacciones ( $J_{AA}$ ,  $J_{BB}$  y  $J_{AB}$ ) que se producen a través de los átomos de oxígeno por medio de mecanismos de superintercambio. En un material ferrimagnético estas constantes ( $J$ ) son diferentes debido a que los vecinos que rodean un átomo A o B son distintos. Esto significa que las interacciones AA y BB son diferentes incluso cuando los átomos que ocupan esas posiciones sean idénticos.

Un material ferromagnético tipo *bulk*, reduce su energía magnetoestática generando dominios magnéticos limitados por paredes de dominio, donde los momentos magnéticos en cada dominio se encuentran orientados entre sí, pero orientados al azar con respecto a los momentos de otro dominio adyacente. La formación de dominios y su geometría son el resultado de un balance energético que hace que esta sea mínima. En presencia de un campo magnético externo, las paredes de dominio tienden a desplazarse y alinearse en la dirección del campo destruyendo las paredes de dominio. Cuando todos los momentos se encuentren alineados con el campo magnético aplicado el material alcanza la magnetización de saturación ( $M_s$ ) y la formación de un único dominio magnético. Cuando se ha aplicado un campo lo suficientemente intenso y luego se anula, los momentos magnéticos no retornan a su estado original manteniéndose por tanto una imanación remanente ( $M_r$ ). El campo aplicado para hacer cero esa  $M_r$  será igual a la coercitividad del material ( $H_c$ ), Figura 3a.

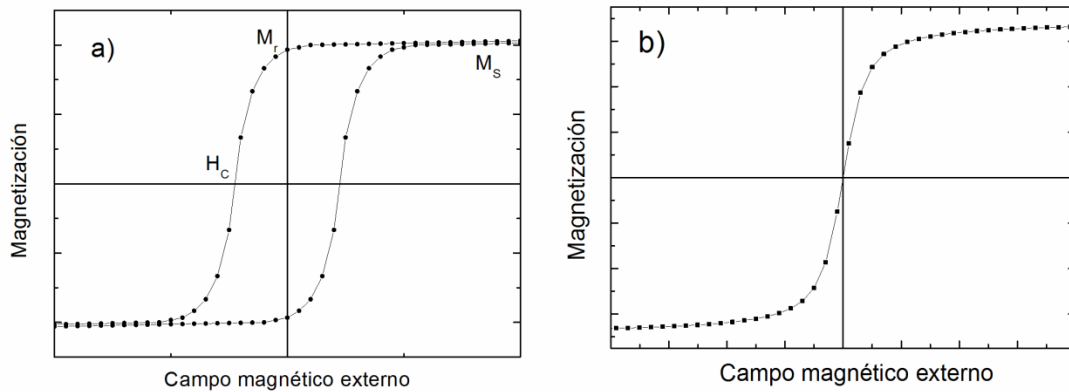


Figura 3. a) Ciclo de histéresis de un material ferro- o ferrimagnético y parámetros magnéticos que se pueden obtener del análisis. b) Ciclo de histéresis de un material superparamagnético.

La generación de paredes de dominio es un proceso energéticamente favorable para materiales ferromagnéticos multidominio con un determinado tamaño de partícula y/o *bulk*. Dependerá su formación por tanto, de la relación entre la energía magnetoestática que es proporcional al volumen, y la energía necesaria para la formación de paredes de dominio, que es proporcional a la superficie. En el punto en el que la energía magnetoestática sea menor que la energía para la formación de paredes de dominio, se obtendrán nanopartículas con un único dominio magnético. Esto significa que todos los momentos atómicos de las nanopartículas se encuentran alineados en una única dirección, mostrando un momento magnético único. Este monodominio invertirá su imanación en presencia de un campo magnético externo por la rotación del momento magnético y no por el desplazamiento de paredes de dominio [21]. El diámetro de partícula crítico que delimita estos dos procesos se denomina  $D_c$ , por debajo del cual no es energéticamente favorable crear paredes de dominio. Este tamaño, que depende de cada material, marca la frontera entre partículas monodominio y multidominio y presentará el máximo valor de coercitividad. Por debajo del tamaño  $D_c$  el material ferromagnético monodominio verá reducida su coercitividad con la reducción del tamaño de partícula, ya que las fluctuaciones térmicas en NPs más pequeñas comienzan a ser más importantes que el momento magnético de las mismas, hasta alcanzar un diámetro donde la coercitividad se anule, tamaño  $D_{sp}$ , que delimita la región superparamagnética (SPM) de la ferromagnética (FM), por debajo de este tamaño, la coercitividad es cero ya que la agitación térmica es suficientemente fuerte como para desmagnetizar espontáneamente un grupo de partículas previamente saturadas, Figura 3b. Una figura que resume las regiones magnéticas y estructuras previamente explicadas se muestra en la Figura 4.

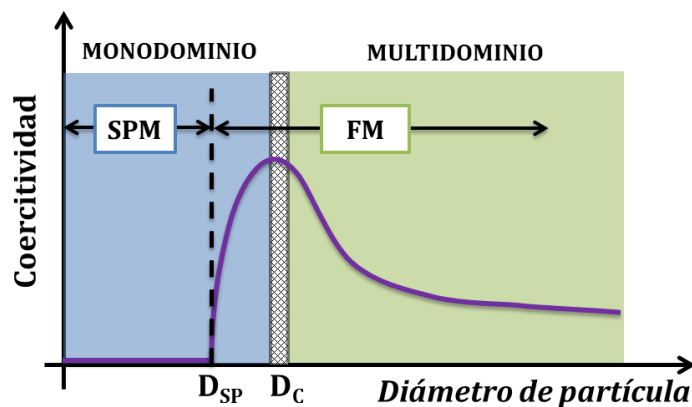


Figura 4. Dependencia del campo coercitivo ( $H_c$ ) con el tamaño de partícula ( $D$ ). Se indican las zonas monodominio (azul) y multidominio (verde) separadas por el tamaño crítico  $D_c$ . El tamaño  $D_{sp}$  separa la región superparamagnética de la monodominio ferri-ferro magnética.

El comportamiento magnético de un material se encuentra determinado por el tamaño del mismo, pero para un mismo tamaño de partícula el comportamiento puede verse modificado por la temperatura del sistema. Un material ferromagnético puede comportarse como superparamagnético o como paramagnético en función de esta. Existe una temperatura denominada temperatura de bloqueo ( $T_B$ ) por debajo de la cual los momentos magnéticos globales de las partículas se encuentran congelados y el material se comporta como super-ferromagnético, pero por encima de dicha temperatura la energía térmica es suficientemente elevada para sobreponerse a interacción magnética inter-partícula que hace que los momentos se alineen entre sí. En esta región el material se comporta como superparamagnéticos con una  $M_r$  y  $H_c$  despreciables, Figura 3a. La medida de la  $T_B$  frecuentemente se realiza mediante las curvas zero field cooled/field cooled (ZFC/FC) y la aparición en un determinado valor va a depender del campo magnético que se le aplica, cuanto mayor sea este menor será la  $T_B$ , Figura 5a. Existe otra temperatura característica de los materiales magnéticos denominada de Curie ( $T_C$ ), si el material es ferromagnético o de Néel ( $T_N$ ) si el material es antiferromagnético. Esta temperatura se alcanza cuando la energía térmica rompe el orden magnético entre las subredes y dentro de ellas, en ese momento y para temperaturas superiores a  $T_N$  o  $T_C$  el material tiene comportamiento paramagnético, con los momentos magnéticos atómicos desordenados, Figura 5b. El campo coercitivo disminuye al aumentar la temperatura hasta anularse una vez alcanzada la  $T_N$ . La magnetización que presentan los materiales ferrimagnéticos por debajo de su temperatura de orden, (temperatura de Néel,  $T_N$ ) es dependiente del campo magnético aplicado y se va a definir como temperatura de orden ( $T_0$ ).

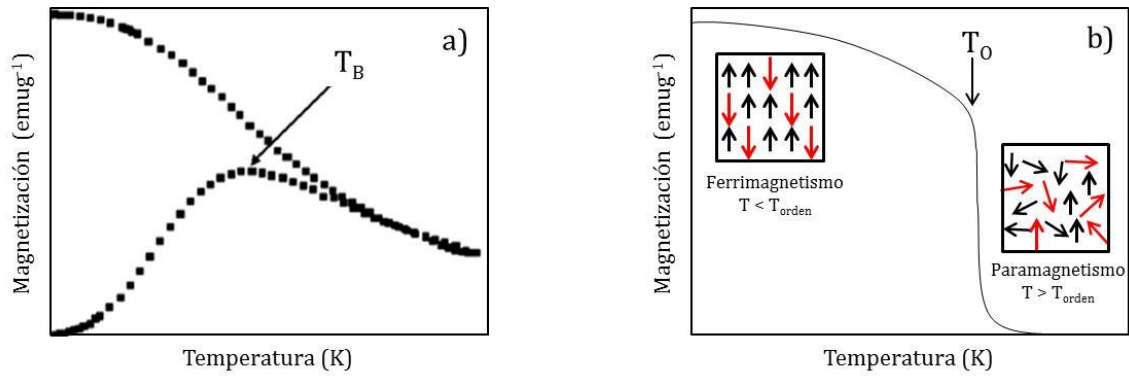


Figura 5. a) Medida ZFC/FC y aparición de la  $T_B$ . b) Evolución de la magnetización de un material ferrimagnético al aplicarle un campo externo e ir aumentando la temperatura, aparición de  $T_0$ .

Las ferritas con estructura espinela inversa presentan una temperatura de orden ( $T_0$ ) mucho más elevada que la ferritas con estructura directa ya que en las primeras la interacción de superintercambio es del tipo A-O-B que es más fuerte. Así, el compuesto  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , presenta una ( $T_0 \approx 800$  K), para la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y de  $\approx 860$  K para la ferrita de níquel ( $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ), sin embargo la ferrita de manganeso ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ) que es preferentemente directa tiene una  $T_0$  de 573 K, todas ellas en tamaño *bulk* [15]. Estas temperaturas pueden variar en función del tamaño de la nanopartícula [22-24].

Además de encontrarse íntimamente relacionadas las propiedades magnéticas de un material con el tamaño del mismo, con la temperatura y campo magnético externo aplicado durante el ensayo, existe también una fuerte dependencia entre el tiempo de medida y el tiempo de relajación del material al aplicarle un campo magnético externo, de modo que podrá comportarse como SPM o FM en función de la relación entre el tiempo de medida ( $\tau_M$ ) y el tiempo de relajación magnético ( $\tau_R$ ), como se mostrará en la sección 1.5.1.1.

Existe una relación directa entre la magnetización de saturación y el momento magnético total de la estructura, ecuación (1.1), que va a depender principalmente del peso molecular ( $P_M$ ) de la muestra, (en el caso de ferrita de cobalto  $234.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) y dónde N son los magnetones de la muestra,  $\mu_B$  es  $9.274 \cdot 10^{-24} \text{ J}\cdot\text{T}^{-1}$  y  $N_A$  es el número de Avogadro.

$$M_s = \frac{N \cdot \mu_B \cdot N_A \cdot 10^3}{P_M(\text{CoFe}_2\text{O}_4)} \quad (1.1)$$

En el caso de la ferrita de cobalto, los iones  $\text{Fe}^{3+}$  presentan momento de spin  $S = 5/2$ , y momento orbital  $L = 0$ , es decir, cada ion contribuye con  $5\mu_B$  (magnetones de Bohr) al momento de saturación. Los iones  $\text{Co}^{2+}$  tienen spin  $S = 3/2$  y por tanto contribuye con  $3\mu_B$  al momento de saturación, además de una posible contribución residual del momento orbital. El número efectivo

por fórmula unidad de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  debería ser  $(2 \cdot 5\mu_B) + (1 \cdot 3\mu_B) = 13 \mu_B$ , si todos los espines fueran paralelos, en cambio no es así, dando un valor teórico de  $3 \mu_B$ . Esta discrepancia es debida a las ocupaciones de los átomos de  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en la red. Los momentos del catión  $\text{Fe}^{3+}$  ( $5\mu_B$ ) se anulan por el antiparalelismo de sus momentos en los sitios A y B, por tanto los momentos del  $\text{Co}^{2+}$  ( $3\mu_B$ ) en posición B, serán los responsables del momento neto de la ferrita. De modo que, sabiendo el grado de inversión de la estructura se puede calcular la magnetización de saturación teórica de la ferrita a 0 K. Por tanto, los magnetones de Bohr del metal divalente ( $\text{Co}^{2+}$ ) se pueden transformar a magnetización de saturación mediante la ecuación (1.1). Considerando estos valores y una estructura ideal de espinela 100% inversa, se obtiene una magnetización de saturación en la ferrita de cobalto de  $71.4 \text{ emu.g}^{-1}$ . En cambio, se demostrará experimentalmente que se obtiene un valor diferente, ya que este material presenta un orden de inversión inferior al 100% [25-27].

A modo de resumen, y como se mostrará en el capítulo de resultados (Capítulo 4), las ferritas de cobalto estequiométricas estudiadas en la presente tesis, se encuadran dentro de los materiales ferrimagnéticos, siendo el régimen monodominio o multidominio el que predomina en función del tamaño de partícula.

### 1.3 Métodos de Síntesis de Nanoferritas de Cobalto

Las propiedades magnéticas de las nanopartículas están enormemente influenciadas por el método de síntesis utilizado para generarlas, ya que la morfología, estructura y composición del material es muy dependiente del proceso de síntesis llevado a cabo. El reto por tanto, para cualquier método de síntesis es alcanzar un tamaño bien definido, con baja distribución, y una buena forma y cristalinidad de las nanopartículas, sin defectos en su estructura y que sea reproducible.

El principal método de síntesis de ferritas ha sido el método cerámico, obteniéndose principalmente partículas de tamaño micrométrico denominado *bulk* o másico. De modo general el método utiliza como precursores sales de los metales constituyentes, como nitratos mezclados por molienda y calentados a  $950^\circ\text{C}$  durante 12 horas [27].

Actualmente los métodos *químicos* más utilizados para sintetizar nanopartículas son; coprecipitación, sol-gel, microemulsión, descomposición térmica en medio orgánico, método hidrotermal, y método de polioles [28-33]. Todos ellos se utilizan comúnmente para sintetizar nanomateriales con distribuciones de tamaño estrechas y de composición homogénea.

A su vez, estos métodos se pueden diferenciar en dos grandes bloques, aquellos que se realizan a temperatura inferiores a 100 °C y medio acuoso (co-precipitación, sol-gel, microemulsiones) y aquellos en las que se descompone los precursores en medio orgánico y altas temperaturas (polioles, descomposición en medio orgánico). La gran diferencia, es que en la síntesis de las NPs en medio acuoso coexiste las etapas de nucleación y crecimiento dando por tanto una mayor dispersión de tamaños, mientras que en la descomposición en medio orgánico tienen lugar dichas etapas de una forma escalonada, obteniéndose nanopartículas más pequeñas y con bajas distribuciones de tamaño. Las síntesis en medio acuoso tienen como principal ventaja que presentan un mayor rendimiento de reacción y que las NPs así obtenidas, no necesitan un cambio de fase posterior para usos biomédicos, además de su sencillez de protocolo, mientras que la descomposición en medio orgánico se realiza en medio apolar de modo que se generan nanopartículas hidrófobas que requieren más etapas para pasarlas a medio acuoso y por tanto una mayor complejidad en el proceso.

A continuación se describirá las principales características de cada uno de estos métodos centrados en los trabajos que se pueden encontrar en la bibliografía de síntesis de ferrita de cobalto hasta la fecha.

### 1.3.1 Método de co-precipitación

El método de co-precipitación es probablemente el método químico más sencillo y más eficiente para la síntesis de nanopartículas magnéticas del tipo  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . Está basado en la precipitación de precursores de sales de los metales que constituyen las nanopartículas en medio básico.

La principal ventaja de este método es la elevada cantidad de material que se puede llegar a sintetizar, sin embargo como principal desventaja tiene el escaso control del tamaño de partícula generado debido a que el único control de la reacción es cinético.

Dos etapas describen el proceso, en la primera ocurre una rápida nucleación hasta que la concentración de las especies alcanza la sobresaturación, en una segunda etapa, los núcleos formados crecen uniformemente mediante difusión de las especies hacia la superficie de la partícula hasta alcanzar el tamaño final. Para obtener nanopartículas monodispersas, estas dos etapas deben separarse; la nucleación debe evitarse durante el proceso de crecimiento [34]. En general, es complicado mantener un nivel de sobresaturación homogéneo a lo largo de todo el volumen de reacción. La forma y el tamaño de las nanopartículas pueden modificarse con relativa facilidad,

ajustando el pH, la fuerza iónica, la temperatura de síntesis, la naturaleza de los reactivos o la proporción de las sales de Fe y Co. Nanopartículas en un intervalo entre 2 y 14 nm pueden ser obtenidas variando la temperatura de síntesis entre 20 y 80 °C [35], o desde 2 a 47 nm variando la temperatura entre 40 y 100 °C a partir de concentraciones estequiométricas de sales de Fe y Co [36]. Quian y colaboradores, obtuvieron NPs de ferrita de cobalto de 2 nm a temperatura ambiente y atmósfera de argón, a partir de sales cloradas de Co y Fe en medio básico, mediante tratamiento térmico posterior a 300, 600 y 800 °C obtuvieron tamaños de NP de 4, 27(44 emu/g) y 40 nm respectivamente [37]. Morais y col. sintetizaron ferrita de cobalto a partir de cloruros con temperaturas de síntesis de 25, 60 y 90 °C para obtener NPs de tamaño 5, 8 y 15 nm (dispersión de tamaño ( $\sigma = 0.26$ )) [38]. Mayor dispersidad de tamaño obtuvieron Wuyou y col. al sintetizar NPs en el intervalo de 26-74 nm a la temperatura de ebullición de la disolución de NaOH y 2 horas de agitación [39]. Como se puede observar existe una gran disparidad de tamaños en las publicaciones referidas, indicando que el método no es muy reproducible. Una estrategia para controlar el tamaño de partícula es la co-precipitación dentro de un espacio confinado formado por micelas, pequeñas gotas de fase acuosa embebidas con un surfactante formando una microemulsión orgánica [40].

### 1.3.2 Método de microemulsiones (micelas)

El método de microemulsiones consiste en la generación de pequeñas gotas de fase acuosa atrapadas o rodeadas de un conjunto de moléculas de surfactante dispersadas en una fase orgánica. La cubierta de fase orgánica provoca un estado de confinamiento que limita la nucleación, crecimiento y aglomeración de las NPs.

En este caso, el tamaño de partícula es determinado por el tamaño de las micelas, definido termodinámicamente con la relación agua-surfactante. El tamaño uniforme de las micelas permite la síntesis de NPs con una distribución de tamaños estrecha, el tamaño se puede controlar fácilmente cambiando la composición de la microemulsión [41].

Gyergyek y col. sintetizaron NPs mediante microemulsión inversa con las proporciones de agua: orgánico (hexano): surfactante (CTAB) de 22:45:33. Partiendo de la mezcla de sales metálicas en medio acuoso, para posteriormente mezclarlo a 50 °C con la fase orgánica y surfactante obteniéndose NPs de  $10 \pm 2.9$  nm medido por imágenes de TEM. Los mismos autores compararon este método con el de co-precipitación obteniéndose en este último caso NPs de  $8.2 \pm 5$  nm, confirmando la mejoría del método con respecto al de co-precipitación [42]. Liu y col. sintetizaron NPs de 9.6 nm mediante la formación de micelas normales a partir de cloruro de Co y Fe en proporción estequiométrica, dodecil sulfato sódico (NaDS) como surfactante, y metilamina, bajo agitación de 3 h y 50 °C [43, 44]. Utilizando otras proporciones de los mismos reactivos Moumen y

col. obtuvieron NPs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  de 2 - 5 nm con un 30% de polidispersidad, el tamaño de las NPs disminuye cuando la concentración de NaDS aumenta [45]. Otros autores también han sintetizado NPs de ferrita de cobalto de 12 nm por este método [46].

### 1.3.3 Método de descomposición en medio orgánico

La descomposición de los precursores de Fe y Co en presencia de surfactantes orgánicos y elevadas temperaturas, está siendo uno de los métodos más usados en los últimos años debido a la obtención de nanopartículas con buen control, estrecha distribución de tamaños y buena cristalinidad. De forma general se utilizan precursores del tipo acetatos metálicos y surfactantes como ácido oleico u oleilamina disueltos en disolventes orgánicos con diferentes puntos de ebullición, del tipo fenil éter (265 °C), bencil éter (300 °C), trioctilamina (365 °C), 1-hexadeceno (274 °C) [42, 47, 48]. El proceso de síntesis de NPs se realiza con dos rampas de calentamiento claramente diferenciadas para separar los procesos de nucleación y crecimiento. El tiempo invertido en cada uno de los procesos influirá en el tamaño del producto final, que en las condiciones de síntesis descritas con anterioridad formará un coloide estable en medio orgánico, como hexano y ciclohexano.

Park y colaboradores [48] describieron el efecto del tipo de disolvente orgánico utilizado en la síntesis de óxidos de hierro, en el tamaño de las nanopartículas obtenidas, debido a su variación en el punto de ebullición, obteniéndose nanopartículas de óxidos de hierro desde 5 nm con 1-hexadeceno (P ebullición 274 °C) hasta 22 nm con trioctilamina (P.e 365 °C). Gyergyek [42] y colaboradores sintetizaron nanopartículas de ferrita de cobalto de tamaño  $\sim 9$  nm, a partir de la descomposición orgánica de acetatos de Fe y Co en éter bencílico en corriente de argón con rampas de calentamiento de 200 °C – 1 h (nucleación) y 290 °C – 2 h (crecimiento). También se ha estudiado la descomposición térmica de acetatos de Fe y Co con surfactantes del tipo ácido oleico, oleilamina y 1,2 hexadecanodiol y con disolventes como fenil éter (265 °C) o benzil éter (300 °C) favoreciéndose la formación de ferrita de cobalto de 3 nm y 10 nm respectivamente, con una estrecha distribución de tamaños [47, 49].

En general nanopartículas de ferritas de cobalto de 3-10 nm se obtienen con facilidad mediante la descomposición térmica en medio orgánico de los precursores metálicos, pero para obtener nanopartículas con mayor tamaño es necesario recrecer las nanopartículas mediante la adición de semillas de reacciones previas [47].



### 1.3.4 Método solvothermal

En general, la síntesis solvothermal ofrece ciertas ventajas sobre otros métodos, debido a su simplicidad, la alta cristalinidad de los productos obtenidos a relativamente baja temperatura ( $< 180$  °C), la capacidad de controlar el tamaño de partícula y la posibilidad de obtener cantidades importantes de producto. Dentro de la síntesis solvothermal, existe un método específico denominado hidrotermal, donde el disolvente utilizado es agua [50]. En ocasiones se realiza la combinación de co-precipitación y síntesis hidrotermal para obtener el producto deseado [28].

Se parte de disoluciones de precursores (sales de  $MNO_3$  donde M son Co y Fe) disueltas en  $H_2O$  o etilenglicol, donde el agente precipitante de los hidróxidos es KOH,  $pH \approx 11$ . Tras esta primera etapa, la mezcla de reacción se calienta en un autoclave a una temperatura superior al punto de ebullición del disolvente generándose una presión mayor a la atmosférica (presión autógena) y favoreciendo la solubilidad de los reactivos. La modificación de los parámetros de síntesis tales como la concentración de los precursores y del agente precipitante, la temperatura y el tiempo de reacción, permite obtener partículas con distinto tamaño, forma y distribución catiónica [27]. La cristalización del producto tiene lugar por un mecanismo de nucleación y crecimiento homogéneos. La nucleación debe ser más rápida que el crecimiento de grano, de modo que se obtienen tamaños de nanopartícula pequeños, si bien, al aumentar el tiempo de síntesis se favorece el crecimiento de grano. Otros autores han descrito la síntesis solvothermal de  $CoFe_2O_4$  a partir de precursores de acetatos metálicos en medio alcohol bencílico o hexanol a  $T^a \approx 180$  °C, mediante el aumento del tiempo de síntesis de 24 h a 48 h con medio bencílico se obtienen NPs de 7.6 y 8.9 nm respectivamente, en cambio utilizando hexanol para un tiempo de 24 h el tamaño queda reducido a 5.9 nm [51]. Cuando la síntesis se realiza en medio acuoso (hidrotermal) se obtienen ferritas de cobalto de mayor tamaño. A partir de nitratos de Fe y Co, en medio acuoso y fuertemente básico (NaOH) y una alícuota de glicerina y  $T^a$  de 180 °C durante 24 h, se obtienen NPs de 30 nm [52]. Blanco-Gutierrez y col. también evaluaron el efecto de tipo de disolvente en el tamaño de NPs de ferrita de cobalto obtenidas, de 9 nm en el caso de utilizar etilenglicol y 16 nm en agua para un tiempo de 168 h y  $T^a = 200$  °C [27]. Zhao y col. [53], sintetizaron por el método solvothermal  $CoFe_2O_4$  y estudiaron el efecto del pH de la disolución, el tiempo y temperatura de síntesis y la relación molar de Fe/Co de partida, obteniendo tamaños de partícula de 5 nm para relaciones estequiométricas de Fe y Co, tiempo de síntesis 2 h, temperatura de síntesis 390 °C y pH 12.

### 1.3.5 Método de polioles

Es un método químico de síntesis muy versátil que da lugar a nano y micropartículas con poca dispersión de tamaños y forma bien definida. Los polioles, como el polietilenglicol (PEG), utilizados como disolventes ofrecen propiedades interesantes, debido a su elevada constante dieléctrica son capaces de disolver compuestos inorgánicos y debido a su elevada temperatura de ebullición ofrecen un amplio intervalo de temperaturas sobre las que poder trabajar. Los polioles también actúan como agentes reductores y estabilizadores, capaces de controlar el crecimiento de la partícula y la agregación.

Durante el proceso, el compuesto precursor es suspendido en un poliol líquido. La disolución es agitada y calentada hasta una temperatura a la cual se alcance el punto de ebullición del poliol. Durante este tiempo el precursor se solubiliza en el poliol, forma un intermedio de reacción que se reduce para dar lugar a las nanopartículas.

Los precursores más utilizados para sintetizar ferrita de cobalto por el método de polioles son los acetatos de hierro y de cobalto en medio dietilenglicol alcanzando valores de tamaños de partículas entre 2 y 6nm [54, 55] o la mezcla de acetato de cobalto y cloruro de hierro alcanzándose valores también próximos a 5nm [56].

En comparación con los métodos acuosos, esta metodología presenta numerosas ventajas. Primero, la superficie de la nanopartícula se recubre en un solo paso con ligandos de polioles hidrófilos, por tanto las nanopartículas son fácilmente dispersables en medio acuoso y otros disolventes polares. Segundo, la elevada temperatura de síntesis favorece la formación de nanopartículas con alto grado de cristalinidad y por último la dispersión de tamaño de nanopartícula es extremadamente estrecha comparado con los métodos de síntesis tradicionales.

### 1.3.6 Método electroquímico

Uno de los retos que se ha querido afrontar en esta tesis es el desarrollo de un nuevo método de síntesis en medio acuoso y bajas temperaturas, que sea sencillo, reproducible y escalable, pensando en futuras aplicaciones. El método electroquímico se basa en la electrooxidación de láminas de metales en medio acuoso gracias a la aplicación de corriente o potencial sobre las mismas. La oxidación de los metales produce iones que precipitan en forma de hidróxidos debido a la existencia de una gran concentración de iones  $\text{OH}^-$  en la disolución debido a la reducción del agua, utilizada

como disolvente. El método puede considerarse análogo al método de coprecipitación, pero en este caso el control sobre el proceso de nucleación y crecimiento de las nanopartículas es mucho más preciso pues los iones se van produciendo en el transcurso de la reacción de electrosíntesis. Las principales ventajas del método electroquímico frente al método de coprecipitación es la reproducibilidad de la estequiometría del compuesto formado. Con respecto a otros métodos como el de descomposición en medio orgánico la ventaja radica en la obtención de las nanopartículas de forma directa en medio acuoso, no necesitándose la adición de un nuevo paso en la síntesis que transfiera las nanopartículas obtenidas en medio orgánico al medio acuoso necesario para cualquier potencial aplicación biomédica. El método electroquímico que se ha desarrollado en la presente tesis es sencillo, poco costoso, se obtienen nanopartículas dispersas en medio acuoso, de baja polidispersidad, buen rendimiento y reproducibles en las mismas condiciones de síntesis. Una discusión en profundidad se abordará en el capítulo de resultados.

Una vez presentados los conceptos básicos acerca de la estructura y magnetismo de las ferritas y una breve descripción de los principales métodos de síntesis de nanoferritas, a continuación se desarrolla de forma resumida los requerimientos necesarios para que un material pueda ser considerado como “biomaterial”.

## 1.4 NPs magnéticas: Requerimientos Tratamientos *in vivo*

Los requisitos principales para que un material inorgánico pueda ser considerado potencialmente de utilidad biomédica cubren aspectos tanto fisiológicos como físico-químicos que se pueden resumir en; *estables en medios acuoso/fisiológicos, con recubrimiento superficial funcional, tamaño hidrodinámico (TH) óptimo, y biocompatibles (baja o nula toxicidad)* y para las aplicaciones que se plantean en este estudio, deben ser *altamente cristalinas, y monodispersas*.

La estabilización coloidal en medios acuoso/fisiológicos de las NPs de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  dependerá de un pequeño balance entre las fuerzas atractivas que las van a agregar (fuerzas de atracción magnética) y las fuerzas repulsivas. La estabilidad de las NPs una vez sintetizadas se puede alcanzar por dos vías, mediante repulsión electrostática, por estabilización estérica o mediante las dos conjuntamente, Figura 6. La estabilización electrostática dependerá de la carga superficial que presenten las NPs, pero también del pH y los iones que se encuentren presentes en el medio de disolución, en cambio la estabilización estérica se produce por la separación física que presentan las NPs cuando se encuentran recubiertas de un material (generalmente polimérico) de cierto espesor,

alejándolas unas de otras y reduciendo la fuerza atractiva magnética que trata de aglomerarlas. Por ello el diseño adecuado de la superficie de recubrimiento de las NPs es crucial a la hora de diseñar nanomateriales para aplicaciones biomédicas.

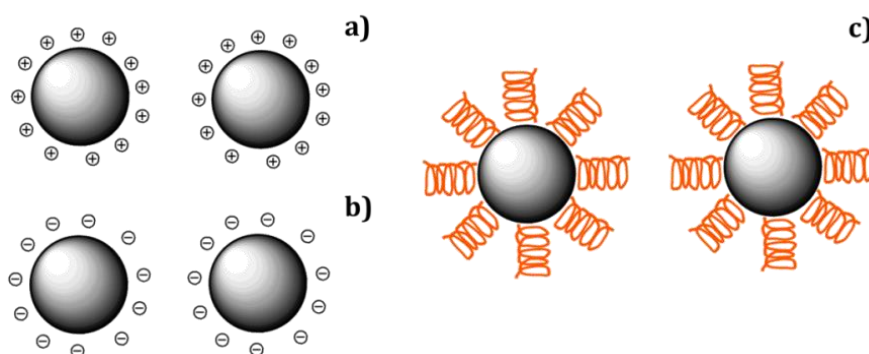


Figura 6. NPs estabilizadas mediante repulsión electrostática (a) positiva, (b) negativa. NPs estabilizadas por repulsión estérica (c).

Diversos materiales se utilizan para recubrir la superficie de las NPs. De modo general los surfactantes y/o polímeros se anclan a la superficie de las nanopartículas químicamente o físicamente.

Se pueden dividir en:

- ✚ Surfactantes de bajo peso molecular; Generalmente moléculas con grupos funcionales del tipo carboxilatos, fosfatos o sulfatos. En la presente tesis se ha utilizado el **ácido cítrico**. Esta molécula es capaz de adsorberse sobre la superficie de la nanopartícula de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  coordinándose mediante uno o dos de los grupos carboxilato, dejando al menos uno libre expuesto hacia el disolvente, lo que confiere hidrofiliidad y carga negativa superficial. Otro ejemplo de moléculas con grupos carboxilato estudiado como recubrimiento es el **ácido fólico**.
- ✚ Poliméricos; Se pueden utilizar para recubrir durante o posteriormente al proceso de síntesis. Principalmente los más utilizados son polímeros como el dextrano, polietilenglicol (PEG), quitosano y polialcohol vinílico (PVA), todos ellos hidrófilos y biocompatibles, no obstante las NPs con PEG presentan un mayor tiempo de circulación en sangre, como se explicará detalladamente más adelante.
- ✚ Inorgánicos; Principalmente sílice u oro. El método más empleado para recubrimientos con sílice es el Método Stöber. Las NPs recubiertas con sílice presentan carga negativa lo que les hace ser redispersables en agua sin adición de otro surfactante y con gran estabilidad. Son fácilmente modificables superficialmente, los espesores que se obtienen se pueden optimizar variando las proporciones de tetraetilortosilicato (TEOS), amoniaco

y agua. Además son muy afines a las NPs de hierro y se adhieren a estas con gran facilidad.

En función del tipo de recubrimiento utilizado las NPs presentarán diferente tamaño hidrodinámico (TH) y carga superficial, viéndose afectada la respuesta que presentan tanto *in vitro* como *in vivo*. Además el uso de recubrimientos y/o ligandos de funcionalización con receptores específicos de determinadas líneas celulares, ofrecerá una mayor respuesta a la internalización celular. Una breve descripción de las mejores condiciones de TH, carga superficial y funcionalización específica que a priori deben presentar las NPs para obtener una buena respuesta en tratamientos tanto *in vitro* como *in vivo* se presentará a continuación. Por último se valorará la toxicidad de las NPs en relación a estos tres parámetros descritos.

#### **1.4.1 Tamaño hidrodinámico – carga superficial – funcionalización específica**

Las NPs presentarán diferentes tamaños hidrodinámicos en función del tipo de recubrimiento y del tamaño del núcleo magnético. Por ejemplo las cubiertas poliméricas presentan mayor TH que las que contienen ligandos anclados o lípidos. Tanto la carga superficial como el TH juegan un papel importante en la interacción celular, en la circulación *in vivo* y en la permeabilidad a través de los tejidos. Pero no solo estos dos factores, que se analizarán seguidamente, son de vital importancia, si no que la funcionalización de la superficie de las NPs con moléculas orientadoras, favorece el reconocimiento selectivo de receptores específicos de membrana o antígenos en las células diana, favoreciendo su internalización. Existen muchos tipos de moléculas orientadoras desarrolladas, principalmente anticuerpos, ácidos nucleicos y otros tipos de estructuras (proteínas, péptidos y moléculas de pequeño tamaño) [57]. De todos ellos los anticuerpos son los más utilizados en las últimas décadas, un ejemplo de ellos es el anticuerpo anti-HER-2 que interacciona específicamente con células tumorales de cáncer de mama que sobreexpresan receptores de crecimiento epidérmico humano (HER-2) [58]. En cuanto a moléculas pequeñas el ácido fólico es de sobra conocido como un ligando orientador que se une a los receptores de folato con gran afinidad, sobreexpresados en algunas líneas celulares tumorales [59]. La eficacia de la interacción entre las NPs funcionalizadas y los receptores celulares es muy dependiente del tipo de molécula funcional utilizada, así moléculas pequeñas son preferibles a las de mayor tamaño para obtener un mayor control del TH.

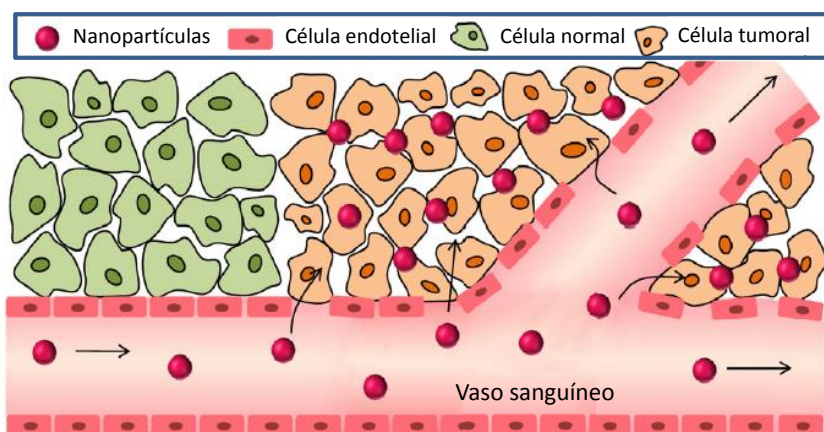
### 1.4.2 Las NPs en su trayecto a las células - barreras *in vivo*

El sistema de defensa del cuerpo humano intrínsecamente presenta una serie de barreras biológicas dedicadas a la protección contra agentes externos [60]. Estas barreras pueden restringir la función de las nanopartículas, bloqueando su movimiento, provocando cambios físicos en ellas, etc...

Las vías a través de las cuales las NPs son introducidas en el organismo pueden ser múltiples, la vía intravenosa o parenteral es la más comúnmente utilizada. Una vez introducidas las nanopartículas rápidamente se encuentran en la sangre, de composición heterogénea y fuerza iónica elevada, pudiéndose producir la agregación de las mismas mediante interacciones electroestáticas en el caso de NPs con carga, alterando sus propiedades magnéticas e induciendo su captura. Para evitar estos inconvenientes se suelen utilizar NPs con carga superficial neutra y elevada estabilidad en condiciones fisiológicas. Su biodistribución dentro del organismo es muy dependiente del tamaño hidrodinámico, generalmente una vez introducidas en el torrente sanguíneo se acumulan en hígado y bazo debido a su fácil captación por el sistema reticuloendotelial (RES), mediante la interacción inespecífica de las nanopartículas con las proteínas del torrente sanguíneo (opsonización) estas son recubiertas y se hacen más visibles para que el RES las reconozca y elimine [61]. Por lo general esta acumulación en RES es menor cuando las NPs presentan valores de TH < 10 nm quedando por contrapartida una mayor distribución acumulada en los órganos [62]. El proceso de opsonización ocurre en mayor medida en nanopartículas con elevada carga superficial e hidrófobas, siendo “más” invisible para nanopartículas hidrófilas y neutras [63]. La facilidad de las nanopartículas para ser eliminadas por las barreras biológicas también se ve influenciada por la forma de estas, así las NPs con forma alargada evitan de manera más eficiente la bioeliminación que las esféricas [64]. Por ejemplo, el TH límite para ser excretadas en su totalidad por el riñón es de 5.5 nm [65]. Para alcanzar el órgano objetivo el TH debe ser inferior al tamaño límite marcado por la barrera de dicho órgano. Esta descrito que NPs con TH inferiores a < 20 nm se excretan por vía renal, mientras que las NPs de tamaño comprendido entre 100 – 200 nm son acumuladas en hígado y bazo. En general NPs del orden de ~ 10 nm, pueden ser invisibles para el RES y no ser excretadas rápidamente por el sistema renal. Un tamaño adecuado para su uso en biomedicina estaría comprendido entre los 50 y 100 nm.

El tamaño de poro de las paredes endoteliales es otra barrera que delimita la llegada de las NPs a los tejidos diana deseados. En la mayoría de los casos, las células endoteliales están estrechamente delimitadas entre sí y limitan la penetración de las nanopartículas. Sin embargo, la absorción significativa de las nanopartículas puede ocurrir en los tejidos mediante el efecto EPR (“*enhanced permeation and retention*”), que es la estrategia más popular de vectorización pasiva de

las NPs hacia los tumores [66]. El EPR, se basa en que las células tumorales, en el esfuerzo de crecer rápidamente, estimulan la producción de nuevos canales o vasos sanguíneos que están mal organizados y tienen fenestraciones, Figura 7. Esto permite el trasvase de pequeñas macromoléculas y NPs de los vasos sanguíneos hacia el tejido tumoral [67]. En cambio, este fenómeno se encuentra limitado a tumores específicos y metastásicos, una mejoría en el EPR dependerá de un gran número de factores como el grado de desorden en los capilares y la velocidad de drenaje linfático [68].



*Figura 7. Representación esquemática de la vectorización pasiva de NPs hacia células tumorales debido al aumento de la permeabilidad y la retención (EPR) [69].*

Una vez que las nanopartículas llegan al tejido diana existe una última barrera que tienen que sobrepasar para adentrarse en el interior celular. Las células internalizan pequeñas moléculas, como oxígeno, aminoácidos, azúcares e iones a través de la membrana, por difusión o bien atravesando los canales proteicos de las membranas. Sin embargo a las NPs y macromoléculas de tamaño nanométrico generalmente se las considera como no aptas para atravesar la membrana celular mediante difusión y su internalización debe ser mediada por vesículas unidas a la membrana que facilitan que las NPs se adentren en la célula vía mecanismos de endocitosis [70].

La endocitosis es un proceso mediante el cual las células capturan moléculas extracelulares formando vesículas a través de su propia membrana dando lugar a dos principales mecanismos de endocitosis, Figura 8. La fagocitosis, absorción de patógenos de gran tamaño, mediante macrófagos y la pinocitosis, que se produce en la mayoría de las células y presenta al menos cuatro mecanismos principales: (i) macropinocitosis, y las endocitosis mediadas por (ii) clatrina, (iii) caveolina y la (iv) endocitosis independiente de clatrina y caveolina. La macropinocitosis es un proceso basado en las fibras de actina que permite a partículas  $>$  de  $1\ \mu\text{m}$  entrar por vesículas. El resto de mecanismos de pinocitosis se clasifican por la proteína responsable de la formación de la vesícula. La endocitosis mediada por clatrina es la principal vía de endocitosis, la proteína clatrina es la responsable de la formación de la vesícula revestida. La endocitosis mediada por caveolina es la absorción a través de



la invaginación de la membrana plasmática, por último la ruta endocítica independiente de caveolina y clatrina es la menor reportada en la literatura.

La tasa y el mecanismo de internalización celular de las NPs pueden variar con la línea celular y depende de muchos parámetros como son la forma, el tamaño, la carga superficial, el estado de agregación, la hidrofobicidad y la longitud de las moléculas que la recubren.

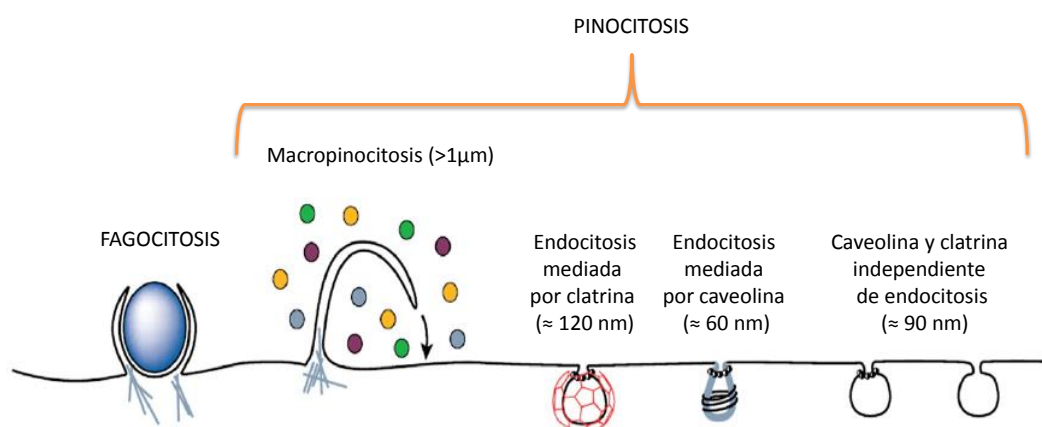


Figura 8. Esquema de las principales rutas de endocitosis [70].

La naturaleza de la membrana celular generalmente formada por dominios cargados negativamente como fosfolípidos con cabezas de grupos cargadas negativamente y proteoglicanos polisulfatados hacen que las NPs con cubierta positiva presenten interacciones electroestáticas que favorecen las adsorciones de membrana [71]. La internalización celular se encuentra favorecida por tanto con recubrimientos de NPs positivos. Por otro lado, las cubiertas negativas son más eficientes que las neutras, presumiblemente por la interacción con dominios con carga positiva de la superficie celular, aunque los dominios positivos son más escasos que los dominios negativos [72].

En cualquier caso, la eficacia de la captación celular de las NPs puede explicarse simplemente por el balance entre la fuerza termodinámica para la invaginación y la cinética de difusión del receptor [73]. Las NPs pequeñas tienen un menor número de ligandos para la interacción con los receptores de membrana, y la adsorción de NPs puede no producir suficiente energía para envolver completamente la NP en la superficie, pudiéndose disociar de los receptores antes de ser envuelta por la membrana como resultado de la baja afinidad de unión. En contraste, las NPs más grandes pueden presentar unión multivalente con los receptores de la membrana debido a la mayor área superficial y mayor número de ligandos, que pueden producir la energía suficiente para la envoltura de membrana. Sin embargo, tales interacciones utilizan un gran número de



receptores de membrana, que pueden causar el agotamiento del receptor cerca de la zona de las NPs. Esto puede impedir la endocitosis de las futuras nanopartículas mediante la limitación de la cinética de difusión del receptor. Aunque se ha demostrado que las nanopartículas pequeñas pueden no ser óptimas para la captación celular, el revestimiento de la superficie con moléculas de vectorización hacia determinados receptores de membrana puede aumentar la acumulación celular. Además de las propiedades fisicoquímicas de las NPs, la endocitosis puede ser modificada añadiendo ligandos específicos a la superficie de las mismas, como transferrina, carbohidratos, ácido fólico o péptidos de internalización celular [74]. Una vez que las NPs entran en la célula mediante vesículas, éstas se fusionan con endosomas, que van disminuyendo su pH a medida que maduran desde endosomas tempranos a tardíos. Los endosomas tardíos terminan fusionándose con los lisosomas, que además del pH ácido contienen enzimas degradativas. Por último, las NPs deben ser excretadas o metabolizadas para evitar su acumulación en el organismo.

### 1.4.3 Toxicidad

Finalmente, la toxicidad de las NPs es uno de los temas más críticos a tratar a la hora de promover el uso de un determinado material para aplicaciones biomédicas. Las NPs pueden inducir toxicidades agudas o crónicas dependiendo de numerosos factores como: composición, tamaño [75], carga [76, 77], concentración, y funcionalización superficial [78]. En general las NPs sin recubrir pueden mostrar cierta toxicidad, aunque mantienen el nivel de supervivencia celular cuando se las recubre de capas poliméricas, si bien existe cierta disparidad de resultados en la bibliografía dependiendo de la concentración máxima estudiada, tiempo de incubación y línea celular utilizada [78]. Uno de los principales problemas tóxicos generados por el uso de NPs sin recubrir o con recubrimientos ineficientes, es la generación directa de especies reactivas de oxígeno (ROS) debida a la presencia de los iones de las NPs tras ser degradadas enzimáticamente [79] en hierro elemental por las enzimas hidrolíticas o las condiciones ácidas presentes en los lisosomas celulares. La generación de ROS en exceso da lugar a estrés oxidativo: pudiendo interaccionar con los lípidos dando lugar a daños en la membrana celular, o con proteínas, y con el ADN causando la ruptura de las hebras, acelerando el envejecimiento y muerte celular [80].

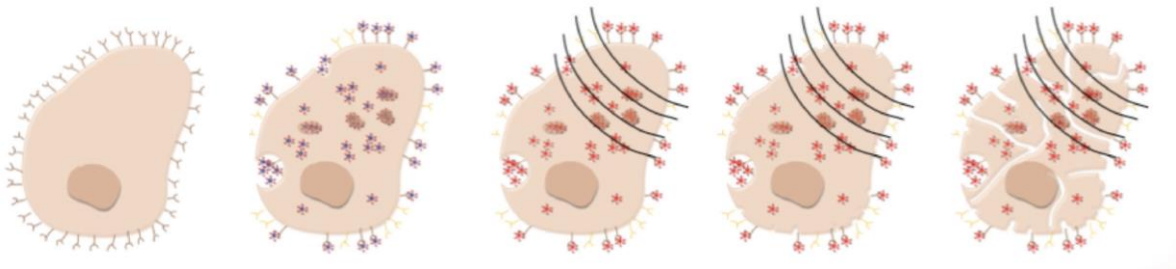
Por tanto el perfil farmacocinético de las NPs, es decir, los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción deberían ser tenidos en cuenta a la hora de estudiar la idoneidad de una NP para un uso biomédico. De modo que el correcto diseño de las NPs comprendería los siguientes aspectos; para una máxima acumulación en el tumor las NPs deben ser estables y presentar elevado tiempo de permanencia en sangre, un TH adecuado para no ser excretado ni eliminado por el RES antes de ejercer su acción terapéutica y/o diagnóstica, ser

selectiva para alcanzar mayoritariamente su sitio de acción y ser capaz de llegar a la células diana, un tamaño lo suficientemente grande para que atraviesen las células endoteliales hacia el tejido diana a una velocidad adecuada y una relación de entrada y de salida de las NPs en las células tumorales también adecuada, y no ser tóxica. Finalmente las nanopartículas deben de ser excretadas o metabolizadas para evitar su acumulación en el organismo.

## 1.5 Aplicaciones Biomédicas

### 1.5.1 Hipertermia magnética

A día de hoy la hipertermia magnética se presenta como una de las terapias más prometedoras para tratamiento contra el cáncer. Principalmente la NPs magnéticas se utilizan como “mediadores de calor”, debido a la capacidad de desprender calor que presentan cuando se encuentran bajo la acción de un campo magnético alterno. Dependiendo del calor generado, se puede producir la muerte por apoptosis (hipertermia moderada, 41 - 46 °C) o necrosis (ablación con  $T^a > 47$  °C) [81], Figura 9.



*Figura 9. Las nanopartículas funcionalizadas son internalizadas a través de vesículas, endosomas y lisosomas debido a la presencia de receptores en la superficie celular. El campo magnético aplicado induce la muerte celular por medio de diferentes mecanismos.*

Que el tratamiento de hipertermia moderada sea prometedor está fundamentado en el hecho de que las células tumorales son más sensibles que las sanas a las variaciones de temperatura, ya que las primeras están sometidas a hipoxia (debido al elevado consumo de oxígeno en la rápida proliferación celular), lo que provoca una menor resistencia al calor. El estrés celular provocado por el calor, provoca la activación o iniciación de numerosos mecanismos de degradación intra- y extracelulares como, desnaturalización y plegamiento de proteínas, agregación o entrecruzamiento del ADN [7, 82].

A día de hoy la estrategia más estudiada es la combinación de la hipertermia con otros tratamientos oncológicos, como radioterapia y quimioterapia, ya que se ha observado una respuesta sinérgica superior comparada con el exclusivo tratamiento de hipertermia. En concreto, ya se ha estudiado sobre células HeLa el uso combinado de hipertermia y quimioterapia con magnetoliposomas, en cuyo interior se encuentran NPs de magnetita y paclitaxel (quimioterapéutico), comprobando el efecto sinérgico del uso combinado [83]. Una posible explicación de por qué la utilización conjunta de ambas terapias es beneficiosa es que la hipertermia aumenta la fluidez de membrana, en comparación con las células sanas, y esto puede contribuir a un aumento de la potencia del agente quimioterapéutico en células previamente tratadas con hipertermia magnética [84]. Pero el efecto combinado de estas dos terapias no solo causa muerte celular sino que también estimula la respuesta inmune. Un ejemplo de ello se ha comprobado en estudios *in vitro* con células de melanoma, donde tras el tratamiento combinado se producen proteínas de choque térmico, específicamente Hsp72, las cuales son responsables de desencadenar la respuesta inmune contra las células tumorales [85].

En cuanto a la utilización exclusiva de hipertermia magnética, se han descrito en numerosos estudios la existencia de una mayor muerte celular por apoptosis tras el tratamiento de hipertermia magnética comparado con la muerte celular provocada al tratar la misma cantidad de células a una temperatura aproximada de  $\approx 46^{\circ}\text{C}$  durante el mismo tiempo [86, 87]. Por otra parte, debido a las diferentes rutas metabólicas de las NPs en función del tipo de línea celular utilizado, parece razonable asumir que los mecanismos de muerte celular que envuelven el proceso de hipertermia magnética deben depender de la línea celular investigada, además de parámetros experimentales como, la cantidad de NPs por célula y la amplitud y frecuencia del campo magnético utilizado. De modo que intentar fusionar diferentes datos experimentales para concluir con un mecanismo universal de muerte celular no es del todo útil. Estudios bibliográficos revelan que los mecanismos de muerte celular después del tratamiento de hipertermia, para la misma línea celular y condiciones experimentales, no es solo una cuestión de incremento de temperatura, pudiéndose producir un desencadenamiento de hechos tras el tratamiento que acaban provocando la muerte celular. Esto está en acuerdo con lo observado por numerosos grupos, que cuantifican muerte celular tras el tratamiento sin haber observado incremento de temperatura a nivel macroscópico. Por ejemplo, Villanueva y col [88] han observado la muerte celular por apoptosis de células HeLa utilizando NPs del tipo peruskitas de manganeso, después de 30 minutos de tratamiento ( $f = 100 \text{ kHz}$  y  $\mu_0 H_{AC} = 15 \text{ mT}$ ), mientras que el incremento de temperatura en el medio de cultivo observado era inferior a  $0.5^{\circ}\text{C}$ . En otros estudios, se observa que tiempos de tratamiento de 2 horas y  $\mu_0 H_{AC} = 47 \text{ mT}$ ,  $f = 233 \text{ kHz}$  provocan la reducción de la viabilidad celular en un 99%, en células MDA-MB-468 y MCF-7, sin un incremento perceptible de temperatura [89]. Estos son algunos ejemplos que revelan que la muerte celular no es un tema sencillo de tratar. Algunos autores revelan que la reducción de la viabilidad

celular puede deberse a la ruptura de los lisosomas durante el tratamiento de hipertermia debido a la presencia de las NPs en su interior, vertiéndose el contenido de los lisosomas al citoplasma que desencadena en muerte celular [90]. Carrey y col. recientemente han propuesto un mecanismo de muerte celular no térmico, basado en que las NPs pueden generar ondas de ultrasonidos cuando son sometidas a un campo magnético alterno [91]. En resumen, para aquellas células con la capacidad de incorporar grandes cantidades de NPs en su interior el daño por la generación de calor en su interior parece el mecanismo más comprensible de muerte celular, por otro lado, las NPs también pueden afectar a las células por otros mecanismos no térmicos, pudiendo originar mecanismos de muerte celular a través de la disrupción de las rutas metabólicas celulares.

Los principales inconvenientes de la hipertermia magnética, se presentan cuando el calentamiento de los tejidos celulares afectados provoca también el aumento de temperatura en células sanas, efecto que puede ser controlado mediante la acumulación de las NPs en el tumor gracias a la funcionalización y vectorización de la superficie de las nanopartículas hacia las células tumorales mediante ligandos de superficie [92], evitando una acumulación excesiva en las células sanas. Además la efectividad del tratamiento dependerá del calor generado en el tejido que es función directa de la cantidad de nanopartículas necesarias para producir hipertermia celular, del tiempo de exposición y de las características de las células tumorales [93].

Estudios recientes están siendo focalizados en la cuantificación de los incrementos locales de temperatura en comparación con la temperatura global del medio circundante, y en cuantificar los gradientes de temperatura con respecto a la distancia desde la superficie de la NP. En este sentido Rinaldi y col. [94] han diseñado un sistema basado en el recubrimiento de las NPs con un polímero fluorescente que cambia su intensidad de fluorescencia a 35 °C, de modo que se cuantifica exclusivamente si la temperatura en la superficie de la NP es superior o inferior a 35 °C pero se desconoce el valor exacto alcanzado. Recientemente, en un estudio llevado a cabo por Riedinger y col. [95] se realiza una medición exacta de la temperatura basándose en la descomposición térmica de una molécula termosensible. De este modo fueron capaces de cuantificar la temperatura local a una distancia inferior a 0.5 nm de la superficie de la NP y determinar que a una distancia de 5 nm de la misma el incremento de temperatura se hace cero ( $\Delta T = \Delta T_{\text{local}} - \Delta T_{\text{global}}$ ). En otro trabajo recientemente publicado por Dias y col. [96] han conseguido determinar la temperatura de la superficie de la nanopartícula funcionalizándola con hebras de ADN unidas a diferentes fluoróforos, de modo que correlacionan la desnaturalización del ADN cuantificado por fluorescencia después de la aplicación del campo magnético con la temperatura de la superficie de la NP.

### 1.5.1.1 Mecanismos de calentamiento por hipertermia

Las NPs magnéticas diseñadas para aplicaciones biomédicas deben de combinar ciertas características, desde tener buenas propiedades coloidales hasta apropiadas propiedades magnéticas, para obtener una respuesta adecuada [17]. En este apartado se mostrarán los requerimientos de las NPs en cuanto a sus propiedades magnéticas, ya que los requisitos en cuanto a propiedades coloidales como, TH pequeño y distribución estrecha, han sido ampliamente abordados en la sección previa. Unas buenas propiedades magnéticas vendrían definidas por una alta magnetización de saturación y una elevada susceptibilidad magnética. La forma y tamaño de la nanopartícula son características que van a determinar el momento magnético y el mecanismo de inversión de la magnetización que tendrá lugar en respuesta al campo magnético alterno aplicado. El grado de cristalinidad y las interacciones magnéticas entre las partículas también tienen una fuerte influencia en las propiedades magnéticas. En muchas ocasiones, la ausencia de defectos estructurales, la presencia de impurezas, la formación de agregados irreversibles y la composición de la muestra va a depender del método de síntesis utilizado y por tanto también afectará a estas. Por tanto, la eficiencia del calentamiento en hipertermia dependerá de las propiedades inherentes al material, como el tamaño hidrodinámico, distribución de tamaño tanto magnético como hidrodinámico, forma, cristalinidad, composición química, concentración y viscosidad del medio, pero también de otras propiedades no inherentes, como la amplitud y la frecuencia del campo magnético utilizado [4].

Los mecanismos físicos a través de los cuales las nanopartículas magnéticas producen calor en presencia de un campo magnético alterno son regidos por los procesos de imanación y desimanación de las partículas según uno de los siguientes mecanismos o la combinación de ellos [6];

**Pérdidas debidas a las CORRIENTES DE EDDY;** según la ley de inducción electromagnética de Faraday-Lenz, cuando un campo magnético AC es aplicado sobre una muestra conductora se generan corrientes de Eddy que dependerán de la frecuencia y de la conductividad eléctrica del material. Las ferritas son típicamente materiales con elevada resistividad eléctrica por tanto las pérdidas de calor debido a las corrientes de Eddy son despreciables. Las corrientes de Eddy no son exclusivas de materiales magnéticos, los tejidos aunque contengan una baja conductividad también las presentan, por ello, se ha limitado un valor máximo del producto de  $f \cdot \mu_0 H_{AC} < 4,85 \cdot 10^8$  A/m.s.

**Pérdidas en nanopartículas MULTIDOMINIO;** son las pérdidas por histéresis generadas cuando a un material ferro/ferrimagnético multidominio (tamaño  $> D_c$ ) se le aplica un campo magnético alterno. El proceso responsable de la magnetización es el movimiento de paredes de

dominio. Para que los espines de un determinado dominio giren en la dirección del campo es necesario que las paredes se desplacen y es un proceso irreversible, es decir las curvas de magnetización según aumenta el campo y según disminuye no coinciden, y produce calor bajo la acción de un campo magnético AC. Estas pérdidas son menos importantes que las pérdidas de NPs monodominio.

**Pérdidas en nanopartículas MONODOMINIO;** cuando a un conjunto de nanopartículas magnéticas se le aplica un campo magnético alterno ( $\mu_0 H_{AC}$ ) de frecuencia ( $f$ ), tiene lugar la aparición de un ciclo de histéresis. Gracias al campo la partículas se imanar y los momentos se alinean progresivamente siguiendo la dirección del campo aplicado. Este desplazamiento de la imanación se produce por rotación de los momentos en el caso de partículas monodominio.

La relevancia de estos procesos no son los mismos si las partículas son monodominio o multidominio, por lo tanto si el tamaño de estas se encuentra por debajo o por encima del tamaño  $D_c$ , Figura 10.

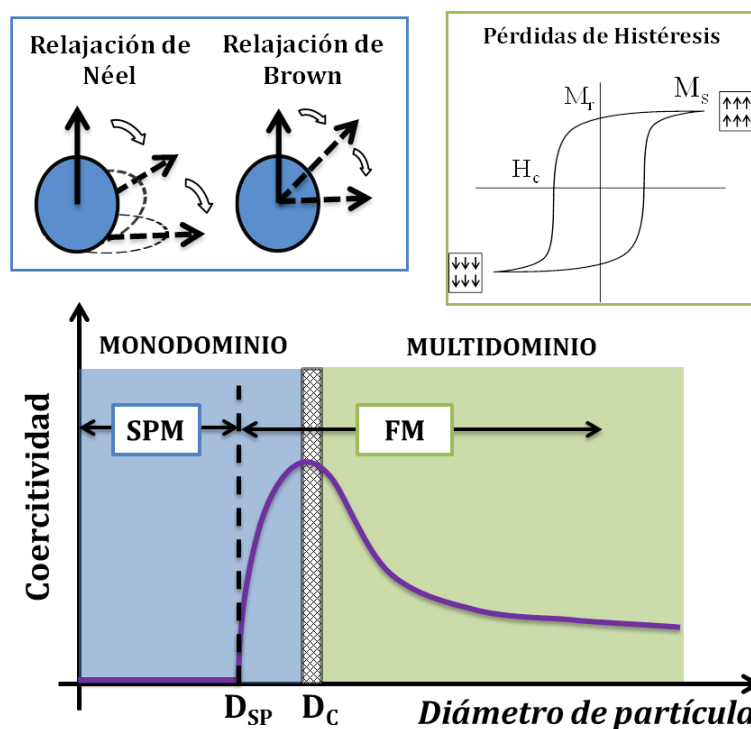


Figura 10. Principales mecanismos de hipertermia por NPs magnéticas (recuadros superiores) y relación de la coercitividad con el tamaño de nanopartícula.

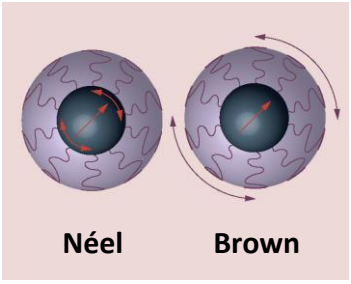
Como se ha explicado con anterioridad existe un tamaño crítico ( $D_c$ ) por debajo del cual la existencia de numerosos dominios magnéticos en un volumen tan pequeño no es energéticamente estable, de modo que la partícula está constituida por un único dominio magnético. Por tanto para el

caso de NPs ferro/ferrimagnéticas pequeñas, de tamaño inferior a  $D_c$  (monodominio), la inversión de la imanación tiene lugar por la rotación de los momentos, ya que no existen paredes dominio que mover. Los momentos magnéticos de cada partícula rotan para sobreponerse a la barrera energética  $E \sim KV$ , donde  $V$  es el volumen del núcleo magnético. Esta energía es disipada cuando el momento de la partícula relaja hasta volver a alcanzar la orientación en estado de equilibrio. Este fenómeno está caracterizado por el tiempo de relajación de Néel ( $\tau_N$ ).

En otras palabras, cuando un campo magnético es aplicado sobre un coloide, el momento magnético de las partículas gira en la dirección de fácil imanación, definido por la red cristalina en la dirección del campo aplicado. El tiempo necesario que necesita el vector de imanación de una partícula para desmagnetizarse tras la aplicación de un campo magnético externo se denomina tiempo de relajación de Néel, Figura 11. Existe otro fenómeno de relajación en el que las partículas que constituyen el coloide efectúan una rotación física con el fin de alinearse en la dirección del campo magnético aplicado, el tiempo que tarda la partícula en realizar este proceso se denomina tiempo de relajación de Brown ( $\tau_B$ ), Figura 11. De modo que el retorno al equilibrio de los momentos magnéticos después de la perturbación provocada por el campo se efectúa ya sea por el movimiento de la partícula (relajación Brown) o por el movimiento del momento magnético en la partícula (relajación Néel). Ambos procesos pueden tener lugar simultáneamente o no, siendo el más rápido de ellos el predominante de la relajación total del sistema,  $\frac{1}{\tau_R} = \frac{1}{\tau_B} + \frac{1}{\tau_N}$ .

Las ecuaciones que rigen cada uno de los procesos y la representación de ambos mecanismos se adjuntan en la Figura 11.

$$\tau_N = \tau_0 e^{\left[ \frac{KV(1-H/H_K)^2}{K_B T} \right]}$$



$$\tau_B = 3\eta V_H / K_B T$$

Figura 11. Tiempos de relajación de Néel y de Brown y ecuaciones que describen cada uno de los procesos.

Según las ecuaciones de la Figura 11, el  $\tau_N$  depende de  $K$  (energía de anisotropía magnética de la partícula), el volumen de la misma ( $V$ ), el campo magnético aplicado ( $\mu_0 H_{AC}$ ), el campo de anisotropía ( $H_K$ ), y finalmente de una constante  $\tau_0$ , cuyo valor está comprendido entre  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$  s, como refleja la ecuación. Mientras que el  $\tau_B$  depende del volumen hidrodinámico ( $V_H$ ) y la viscosidad del medio ( $\eta$ ). En ambas expresiones además aparece la  $K_B$  y los tiempos de relajación son



dependientes de la temperatura. Una expresión más genérica para definir el tiempo de relajación de Néel, se puede expresar como;  $\tau_N = \tau_0 e^{\left[\frac{KV}{K_B T}\right]}$ , siempre y cuando el campo magnético aplicado con respecto al campo de anisotropía sea pequeño.

Dependiendo de la relación entre el tiempo de relajación total ( $\tau_R$ ) y el tiempo de medida ( $\tau_M$ ), que depende de la técnica experimental usada, se producirá dos tipos de respuesta magnética netamente diferentes:

✚ ( $\tau_R \geq \tau_M$ ), las NPs presentarán una curva de imanación irreversible con aparición de histéresis. El ciclo de histéresis resultante, independientemente de cómo se relajen los momentos de la partícula después de la perturbación, va a depender de parámetros externos como la temperatura, de los parámetros del campo aplicado ( $\mu_0 H_{AC}$  y  $f$ ) y de las propiedades magnéticas intrínsecas de las nanopartículas.

✚ ( $\tau_R < \tau_M$ ), las NPs tienen carácter “superparamagnético” no presentan ciclo de histéresis.

Según la ecuación que describe el proceso de relajación de Néel, este tendrá lugar y será el predominante para valores pequeños de  $[KV/K_B T]$  y la viscosidad y el  $V_H$  no son relevantes en el proceso. En contraposición, para altos valores de  $[KV/K_B T]$ , el mecanismo de Brown es el predominante y en este caso el calentamiento dependerá de la viscosidad y el  $V_H$ . Para valores intermedios donde  $T_N \approx T_B$  ambos mecanismos tendrán lugar simultáneamente y la importancia de cada uno vendrá determinada por  $K$ ,  $V_{\text{magnético}}$ , viscosidad,  $V_H$  y  $\mu_0 H_{AC}$ . En el caso de la utilización de ferritas como generadores de calor en ensayos de hipertermia el mecanismo que prevalecerá depende mucho de la anisotropía de las mismas, así la ferrita de níquel presenta valores de  $K \approx 3-6 \cdot 10^3 \text{ J/m}^3$ , la de hierro de  $K \approx 1-5 \cdot 10^4 \text{ J/m}^3$  y la de cobalto de  $K \approx 4-5 \cdot 10^5 \text{ J/m}^3$  [97, 98]. Para un tamaño típico de entre 10 y 30 nm la ferrita de cobalto presentará mecanismo de Brown, la de hierro mezcla de ambos y la de níquel mecanismo de Néel, asumiendo que  $d_{\text{magnético}} \approx d_{\text{hidrodinámico}}$ . En ensayos de hipertermia reales, el TH es generalmente superior al magnético debido a la capa funcional que recubre las NPs, y por tanto influirá en la relación entre ambos mecanismos. Además en el caso de hipertermia celular tiene lugar la adsorción de NPs por la células y tejidos dando lugar a la formación de agregados [99, 100], a consecuencia de ello tiene lugar un drástico incremento del volumen hidrodinámico, además la viscosidad en medio celular es mayor que en el líquido tras la síntesis. Estos hechos provocan la reducción de la eficiencia del mecanismo de calentamiento de Brown. Como consecuencia de  $\tau_N \propto e^{(KV)}$ , la dependencia del calentamiento con el diámetro magnético es muy fuerte y presenta un máximo muy estrecho. Así, el valor del  $d_{\text{magnético}}$  debe ser controlado con precisión y las interacciones entre partículas perfectamente estudiadas para obtener



el mayor calentamiento en un valor específico de frecuencia. Numerosos autores han demostrado que el mecanismo de calentamiento mayoritario en las ferritas de cobalto es el browniano debido a la elevada anisotropía del material [100, 101].

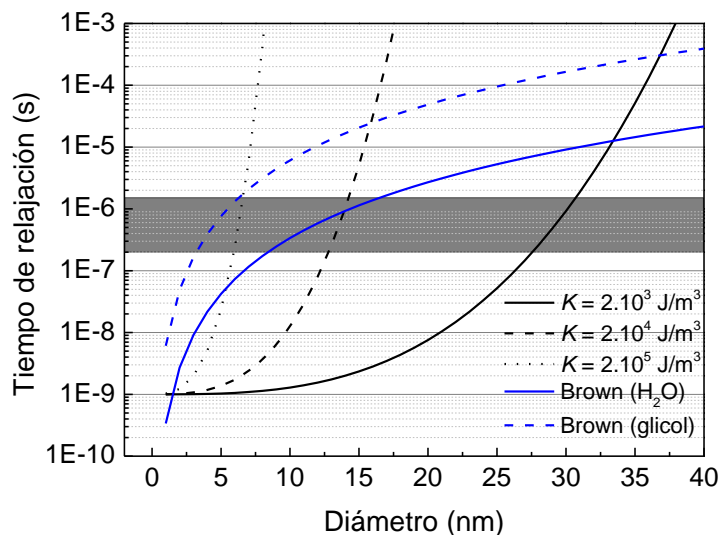


Figura 12. Tiempos de relajación de Néel (línea negra) en función de la anisotropía estimada para ferritas de níquel, hierro y cobalto, y relajación de Brown (líneas azules) en medio acuoso y glicol. Zona sombreada equivale a los tiempos de medida para el rango de frecuencias entre 100 – 800 kHz.

De forma general, para partículas de pequeño tamaño y de baja anisotropía ( $K = 2 \cdot 10^3 \text{ J/m}^3$ ), la pérdida de calor está delimitada por los tiempos de relajación de las partículas, que en este caso es exclusivamente el tiempo de relajación de Néel. La potencia de calor disipado es entonces máxima para un frecuencia de campo  $f$ , definida por la ecuación;  $2\pi f \tau_N = 1$ . Es decir, cuando el tiempo de relajación de las NPs y el tiempo de medida son iguales. En la Figura 12, este valor coincidiría con la zona de corte de la curva de relajación de Néel y la región de frecuencias sombreada.

La cantidad de calor ( $A$ ) liberada por las NPs en un ciclo de histéresis completo equivale al área de dicho ciclo y se describe como;  $A = \int_{-H_{min}}^{+H_{max}} \mu_0 M(H) dH$ , donde  $M(H)$  es la imanación de las NPs. Esta área dependerá principalmente de la anisotropía del material del volumen, de la temperatura, de la frecuencia y amplitud del campo aplicado y de las interacciones entre partículas. El producto del área del ciclo obtenida por la frecuencia es igual al calor disipado por el ferrofluido, ( $SAR = A \cdot f$ ), (SAR, Specific absorption rate) o también denominado SLP (Specific loss power), y se define como la cantidad de calor disipada por unidad de masa del material magnético y unidad de tiempo durante la aplicación del campo magnético AC de frecuencia  $f$ , sus unidades son W/g. Experimentalmente se puede calcular mediante la integración del área del ciclo de histéresis y/o

mediante un sencillo calculo a partir de las curvas experimentales de temperatura vs tiempo y la ecuación (1.2), (en mayor detalle explicado en capítulo 3 - Materiales y métodos).

$$SAR = \frac{P}{m_{NPS}} = C \frac{\Delta T}{\Delta t} \cdot \frac{\rho}{m_{NPS}} \quad (1.2)$$

El valor del SAR para partículas monodominio depende de las condiciones en las que se lleve a cabo la medida y de las propiedades magnéticas de las nanopartículas, tal y como refleja la ecuación de SAR más detallada, ecuación (1.3).

$$SAR = \pi \mu_0^2 \frac{\phi M_s^2 V}{1000 K_B T} H_0^2 f \frac{2\pi f \tau}{1 + (2\pi f \tau)^2} \quad (1.3)$$

dónde  $f$  y  $H_0$  son la frecuencia y la amplitud del campo magnético alterno aplicado,  $\phi$  la fracción en volumen de las partículas,  $V$  el volumen de una partícula,  $M_s$  la magnetización de saturación y  $\tau$  los tiempos de relajación. Entonces, si el campo magnético aplicado es uniforme, el SAR solo dependerá de la fracción de volumen de partículas y de sus características físico-químicas, es decir, del tamaño, la magnetización de saturación, su anisotropía magnética a través de su tiempo de relajación de Néel y de su superficie, de su funcionalización, a través del tiempo de relajación browniano.

A continuación se expone brevemente la dependencia del SAR con todos los factores que afectan al proceso de disipación de calor.

### **Dependencia del tamaño, forma, y composición en el SAR**

Como se ha mencionado anteriormente, el SAR depende directamente de las características estructurales y microestructurales de las partículas, de modo que dependerá del tamaño, forma y composición de las mismas. La dependencia del SAR con el tamaño de partícula no es necesariamente lineal para medidas realizadas en un amplio margen de tamaños. Ciertamente, los valores recogidos en la literatura generalmente reflejan que para una frecuencia y campo magnético dado, el SAR aumenta hasta cierto tamaño de partícula, tras el cual las partículas más grandes producen menor SAR. La distribución de tamaño influye enormemente en el calor disipado por las NPs, de dos modos: (i) las muestras con dispersión de tamaño elevada, presentan numerosas partículas con diferente tamaño y por tanto diferentes eficiencias de disipación de calor y (ii) NPS con tamaños no muy similares presentaran diferentes propiedades magnéticas como  $M_s$  and  $K$ ,

afectando también al calor que puedan disipar. De modo, que una muestra polidispersa tendrá de modo general un valor de SAR menor que la muestra monodispersa pero ofrecerá esta disipación de calor en un rango de frecuencias amplio, mientras que la muestra monodispersa ofrecerá mejores valores de SAR pero solo a la frecuencia adecuada.

La forma de las NPs también está relacionada con  $M_s$  y  $K$  de las mismas. Las muestras esféricas presentan mayor número de defectos en la superficie que las cúbicas, de modo que a priori las NPs cúbicas tendrán mayor  $M_s$  y  $K$  que las NPs esféricas comparadas al mismo tamaño [102, 103]. Diferentes estudios también han demostrado que la forma de nanoflor presenta mayores valores de SAR comparados con la forma de nanocubos de mismo tamaño y medidos a la misma frecuencia y campo magnético [104].

La composición de las NPs también es de vital importancia, ya que se encuentra íntimamente relacionada con las propiedades magnéticas. Los óxidos de hierro son las NPs más utilizadas en biomedicina y generalmente están constituidos por mezclas de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). La magnetita presenta mayores valores de  $M_s$ , de modo que la proporción entre ellas será de vital importancia. Otro tipo de ferritas del tipo  $\text{MF}_2\text{O}_4$  ( $M=\text{Mn, Co, Ni}$ ) también se han estudiado, ya que la introducción de  $M$  en la estructura puede mejorar las propiedades magnéticas del material. En el caso particular de la ferrita de cobalto, estudios previos han corroborado la mejoría del SAR obtenido comparado con el de maghemita, ya que el cobalto aumenta la anisotropía y la  $M_s$  [105]. Por supuesto la cantidad de cobalto que presente la ferrita y en qué posición dentro de la estructura cristalina se encuentre situado afectará a sus propiedades magnéticas y por tanto a la hipertermia [106].

### **Dependencia de las propiedades coloidales, interacciones magnéticas y viscosidad en el SAR.**

El recubrimiento de las NPs para hacerlas biocompatibles puede provocar una reducción de  $M_s$  por disolución de las superficie de las NPs y la reducción del tamaño [107] aunque el anclaje del recubrimiento a la superficie de la NP en otros casos también puede favorecer la reducción del *spin canting* y el aumento de la magnetización de saturación [108].

Las interacciones dipolo-dipolo entre las partículas en el ferrofluido, puede tener gran influencia en el SAR obtenido. Dependen de la concentración y tienen gran influencia en la relajación magnética y en la susceptibilidad. Las interacciones dipolares dependerán del estado de agregación de las NPs, ya que no es lo mismo que las NPs formen agregados que se aglomeren entre sí o que presenten partículas individuales que se aglomeren entre ellas. En el último caso, las interacciones

dependerán de la concentración, cuando la dilución permite separar las NPs individualmente. En cambio, cuando con la dilución se separan agregados de NPs, las interacciones magnéticas seguirán existiendo en el interior de los mismos. Aunque actualmente existe cierta controversia en el efecto de las interacciones dipolares sobre el SAR.

En conclusión, independientemente del mecanismo por el que se produce el calentamiento de las partículas magnéticas, la optimización del tamaño, la distribución de tamaños, la composición química y, finalmente, la superficie de estas, son factores determinantes para hacer de la hipertermia una técnica viable.

### 1.5.2 Resonancia magnética de imagen (RMI)

La resonancia magnética de imagen es una de las más potentes técnicas de imagen no invasivas utilizadas en medicina clínica. Se basa en el principio de que los protones se alinean y realizan movimiento de precesión en la dirección de un campo magnético externo. Aunque el momento magnético del protón sea pequeño, en contra partida la altísima cantidad de protones presentes en un tejido biológico hace que la medida del contraste de imagen en un tejido sea cuantificable. Las NPs magnéticas han sido utilizadas de manera generalizada como agente de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI). La señal que se recoge durante la medida de RMI es debida al proceso de relajación magnética de los espines del núcleo de los protones de las moléculas de agua, en la región de interés. Bajo la acción de un campo externo ( $B_0$ ), el espín nuclear de los protones se alinea en la dirección del campo, dando lugar a un momento magnético neto,  $m$ . Tras la aplicación de un pulso transversal de radiofrecuencia (RF), perpendicularmente a  $B_0$ , los espines nucleares se excitan y comienzan a precesar en el plano perpendicular a  $B_0$ . Tras la eliminación del pulso RF, los espines nucleares recuperan gradualmente su estado de equilibrio paralelo a  $B_0$  mediante un proceso de relajación. Los agentes de contraste se caracterizan por disminuir el tiempo de relajación, existiendo dos tipos de mecanismo diferentes: el proceso de relajación longitudinal ( $T_1$ ) o la recuperación del momento magnético a lo largo de la dirección  $B_0$ , y el proceso de relajación transversal ( $T_2$ ), es decir, la pérdida de señal en el plano perpendicular, como se muestra en la Figura 13.

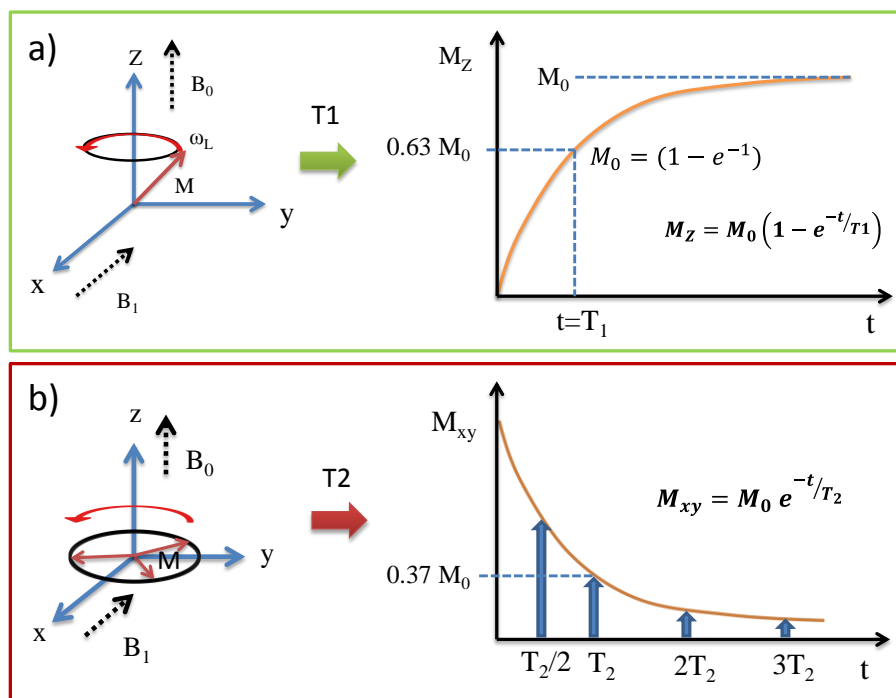


Figura 13. a) Precesión del momento ( $M$ ) del protón del agua a lo largo del eje Z y relajación del momento ( $M$ ) del protón a su estado de equilibrio a través de la relajación longitudinal ( $T_1$ ). b) Precesión del momento ( $M$ ) del protón del agua a lo largo del eje XY y relajación del momento ( $M$ ) del protón a su estado de equilibrio a través de la relajación transversal ( $T_2$ ).

La presencia de NPs en el órgano o tejido genera un campo magnético adicional,  $B_1$ , el cual induce inhomogeneidades de campo locales que incrementan significativamente la velocidad de la relajación transversal del protón (disminución de  $T_2$ ), dando lugar a un contraste negativo u oscurecimiento de la imagen [109]. Este es el motivo por el cual las NPs magnéticas, especialmente los óxidos de hierro son considerados predominantemente como agentes de contraste  $T_2$  [110]. Los tiempos de relajación bien sean  $T_1$  o  $T_2$  son expresados como sus valores inversos, llamados relajatividades, de forma genérica ( $r_i = 1/T_i$ ) y es la medida del incremento de la velocidad de relajación en función de la concentración del agente de contraste.

Por tanto, la eficiencia con la que un agente de contraste (bien sea  $T_1$  o  $T_2$ ) acelera la velocidad de relajación del protón en un medio homogéneo se define como, ecuación (1.5):

$$R_{1,2} = R_{1,2}^{\circ} + r_{1,2}C \quad (1.5)$$

dónde,  $R_{1,2}$  (unidades  $s^{-1}$ ) es la relajación del protón  $T_1$  o  $T_2$  en presencia del agente de contraste,  $R_{1,2}^{\circ}$  son las relajaciones en ausencia del agente de contraste y  $C$  es la concentración del agente de

contraste en (mM). La constante de proporcionalidad  $r_{1,2}$  ( $s^{-1}mM^{-1}$ ) se denomina relajatividad. Las interacciones dipolares entre los protones del agua de los alrededores y el elevado momento magnético de las NPs dan lugar a una elevada relajación longitudinal  $r_1$  y transversal  $r_2$ . Según el modelo propuesto por Koenig y Keller [111](ecuación 1.6), la relajación spin-spin depende del momento magnético de las NPs,  $m$ .

$$R_2 = \frac{1}{T_2} = \frac{a}{d_{NPs}} \gamma^2 m^2 C_{NPs} J(\omega, \tau_D) \quad (1.6)$$

dónde  $a$  es una constante,  $d_{NPs}$ , el diámetro de la nanopartícula,  $D$  el coeficiente de difusión,  $m$  el momento magnético de las NPs,  $\gamma$  la constante giromagnética del protón del agua,  $C_{NPs}$  la concentración de las NPs y  $J(\omega\tau_D)$  la función espectral de densidad. En otras palabras, para que un agente de contraste sea eficiente, las NPs deben tener una elevada magnetización, que es fuertemente dependiente del tamaño, forma y propiedades superficiales [112].

Los agentes de contraste que se mostrarán en la presente tesis son del tipo T2, como los mostrados en la Figura 14, donde se observa el efecto que tiene la utilización de NPs magnéticas en la perturbación del proceso de relajación magnética del protón del agua. De esta figura se desprende que el campo magnético inducido por las NPs provoca la perturbación del proceso de relajación del protón en las moléculas de agua cercanas, resultando en la reducción del tiempo de relajación spin-spin del protón. La variable concentración de agua presente en los diversos tejidos, va a provocar diferentes relajaciones de los protones lo que dará lugar a diferente contraste en función del tipo de tejido.

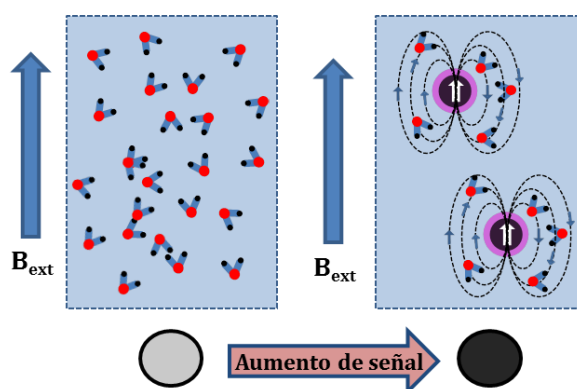


Figura 14. Representación del efecto que provoca las NPs sobre las moléculas de agua del entorno Aumento del agente de contraste negativo T2.

Para la obtención de agentes de contraste T2 eficientes, es necesario controlar las propiedades magnéticas de las NPs, a través del diseño de sus propiedades fisicoquímicas, como

composición, estructura cristalina, forma, tamaño hidrodinámico, carga superficial, naturaleza del recubrimiento, etc... Estas características no solo afectan a la eficacia de las NPs en MRI, sino que también la estabilidad, biodistribución, opsonización y metabolismo, son factores a tener en cuenta. Además ciertos tipos de recubrimientos pueden favorecer la vectorización de las NPs hacia órganos específicos favoreciendo la acumulación del agente de contraste en la zona [113, 114].

Normalmente, la mayoría de agentes de contraste a la venta se componen de SPIO (*superparamagnetic iron oxide*, con TH > 40 nm) en un tamaño entre 60 nm y varias micras. Cuando estas partículas son inyectadas por vía intravenosa son rápidamente capturadas por el RES y acumuladas en el riñón o el hígado, ya que estos órganos son los responsables de la purificación de la sangre. Debido a esta especial acumulación de NPs SPIO, han sido utilizadas para la detección específica de lesiones o tumores en el hígado [115]. El escaso tiempo de vida en sangre de los SPIO, variable entre unos minutos a algunas horas, inhabilita a estas especies para ser utilizadas en reconocimiento específico de tumores con vectorización específica [116]. Por el contrario, las nanopartículas USPIO (*Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxide*, con TH < 40 nm), debido a su menor tamaño no se acumulan de manera preferencial en el RES y presenta mayores tiempos de circulación en sangre [110].

Para un determinado material la máxima magnetización alcanzable correspondería con la saturación del *bulk*, pero en realidad menores valores de  $M_s$  se obtienen cuando el tamaño de la partícula es inferior al del *bulk*, debido a defectos superficiales que hacen que los momentos magnéticos de la superficie se orienten de forma diferente a los del interior y como consecuencia el valor de  $M_s$  se vea reducido [117] o bien provocada por el “*quenching*” del recubrimiento con la superficie de la nanopartícula [118]. La reducción en el valor de  $M_s$  para las NPs de menor tamaño, debido a efectos superficiales, va en detrimento de los valores de relajatividad. Este efecto del tamaño está demostrado en el caso de óxidos de hierro del tipo  $Fe_3O_4$ , donde la variación del tamaño de 4, 6, 9 y 12 nm da lugar a  $M_s$  de 25, 43, 80 y 101 emu/g<sub>Fe</sub> respectivamente. La relajatividad  $r_2$  incrementa gradualmente de 78, 106, 130 y 218 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> [119]. Además en función del método de síntesis utilizado se obtendrán diferentes valores de  $M_s$  y de propiedades magnéticas, estas diferencias son generalmente atribuidas a cambios en el orden cristalográfico, estructura superficial o por la presencia de impurezas.

Los aleados metálicos del tipo FeCo y FePt son otro ejemplo de agentes de contraste [32, 33, 35, 55]. En estos casos todos los espines magnéticos se alinean en paralelo al campo magnético externo, y como resultado presentan mayor momento magnético que las NPs de óxidos de hierro ferrimagnéticos, por esta razón son considerados como agentes de contraste potencialmente

eficientes. Un ejemplo ha sido el desarrollo de NPs de FeCo de 7 nm pasivada su superficie con grafito y recubierta con un fosfolípido de polietilenglicol para asegurar la estabilidad coloidal en medio acuoso. Estas nanopartículas presentan una elevada  $M_s$  de 215 emu/g metal y un valor de  $r_2$  de 644  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , valor más elevado que los publicados para los agentes de contraste comerciales. Se ha publicado recientemente que las NPs de FePt presentan tiempos de relajación  $T_2$  significativamente cortos, y valores de  $r_2$  en torno a 300- 400  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  medido en coloides de concentración 1mM [120]. Seo y col. han publicado valores de  $r_2$  en torno a 600-700  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  en NPs de Fe-Co de 7 nm para concentraciones de coloides de 1mM [121]. Estas NPs, con mayores valores de  $M_s$ , pueden dar lugar a valores comparables a los obtenidos con óxidos de hierro, pero con la necesidad de menores dosis del material. Con estos materiales alternativos, se pueden utilizar NPs de menor tamaño que pueden prolongar el tiempo de circulación en sangre. Lo que puede permitir la obtención de imágenes en áreas de difícil acceso.

Aunque la mayoría de agentes de contraste comerciales estén basados en óxidos de hierro, desde hace unos años se está llevando a cabo una estrategia para dopar los óxidos de hierro con elementos magnéticamente susceptibles que sean capaces de mejorar las propiedades magnéticas y por tanto de reducir el tiempo de relajación  $T_2$ . En el caso concreto de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , se trata de remplazar el  $\text{Fe}^{2+}$  presente en la estructura espinela de la magnetita por otros metales de transición como  $\text{M}^{2+} = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Mn}$  [14, 122, 123]. Como resultado de la configuración electrónica de spin, y suponiendo un orden de inversión ideal de la estructura espinela del 100% los momentos magnéticos de las ferritas  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , y  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  corresponderán con los magnetones de Bohr del metal dopante, 5  $\mu_B$ , 3  $\mu_B$ , and 2  $\mu_B$ , respectivamente. Estas ferritas por tanto, son buenos candidatos para desarrollar agentes de contraste  $T_2$  con elevada relajatividad. Valores de  $r_2$  de 358  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  se han publicado para ferrita de manganeso de  $M_s = 110 \text{ emu/g}(\text{Mn}+\text{Fe})$ ;  $r_2 = 218 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con  $M_s = 99 \text{ emu/g}(\text{Fe})$ ;  $r_2 = 172 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  para ferrita de cobalto de  $M_s = 85 \text{ emu/g}(\text{Fe}+\text{Co})$  y  $r_2 = 152 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  para ferrita de níquel de  $M_s = 85 \text{ emu/g}(\text{Fe}+\text{Ni})$ , la variación de  $r_2$  es evidente que se encuentra relacionada con el valor de saturación [8, 124]. Similares valores hemos publicado para la ferrita de manganeso sintetizada electroquímicamente, con una composición de  $\text{Mn}_{0.5}\text{Fe}_{2.5}\text{O}_4$  y un  $M_s$  de 108 emu/g(Fe+Mn) de  $r_2 = 394 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  [125].

Tras la síntesis, y caracterización magnética es imprescindible el recubrimiento superficial para evitar la desestabilización y aglomeración de la suspensión coloidal y para hacerlas solubles en medio acuoso o biológico, con los mismos requerimientos explicados en secciones previas, sección 1.4, página 18. La magnetita es una de las moléculas más funcionalizadas con anticuerpos de orientación o vectorización como hercipina o rch24 [119, 126]. La degradación de las NPs en el interior celular va a provocar la pérdida del contraste en RMI en numerosos ensayos *in vitro* lo que



provoca un descenso en el diámetro de la NP y por tanto la reducción del contraste T2[127, 128]. La cuantía de esa degradación dependerá de la naturaleza del recubrimiento y por tanto la pérdida de relajatividad también. Las NPs recubiertas con citrato son degradadas más rápidamente, dando lugar a una pérdida de contraste T2 tras una semana de exposición al medio lisosomal de las células [129].

Estos agentes de contraste basados en NPs magnéticas presentan una gran ventaja con respecto a los agentes de contraste paramagnéticos (T1), y es la menor dosis necesaria a introducir en el cuerpo humano con respecto a los contrastes T1. Los agentes de contraste de Gd comercializados requieren una concentración en tejido de  $10^{-7}$  mol/g para obtener suficiente contraste en la imagen [85], además los agente de contraste T1 presentan bajos tiempos de permanencia en sangre. En el caso de utilizar NPs magnéticas se obtiene una buena respuesta de agente de contraste por cada NP, de modo que aumenta la relajatividad efectiva por NP con menores dosis y presentan baja toxicidad, son fáciles de funcionalizar, pudiéndose modular sus propiedades magnéticas con cambios en el tamaño, forma y composición de las NPs.

## Referencias

- [1] European Commission [Online]. [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_activities/nanotechnology/what-is-a-nanomaterial-european-commission-breaks-new-ground-with-a-common-definition](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/nanotechnology/what-is-a-nanomaterial-european-commission-breaks-new-ground-with-a-common-definition).
- [2] Jain, P.;Huang, X.;El-Sayed, I.; El-Sayed, M. Review of some Interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics*. **2007**, 2, 107-118.
- [3] Wu, X.;Liu, H.;Liu, J.;Haley, K. N.;Treadway, J. A.;Larson, J. P.;Ge, N.;Peale, F.; Bruchez, M. P. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotech*. **2003**, 21, 41-46.
- [4] Salas, G.;Veintemillas-Verdaguer, S.; Morales Mdel, P. Relationship between physico-chemical properties of magnetic fluids and their heating capacity. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. **2013**, 29, 768-776.
- [5] Roca, A. G.;Costo, R.;Rebolledo, A. F.;Veintemillas-Verdaguer, S.;Tartaj, P.;González-Carreño, T.;Morales, M. P.; Serna, C. J. Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*. **2009**, 42, 224002.
- [6] Hergt, R.; Dutz, S. Magnetic particle hyperthermia—biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2007**, 311, 187-192.
- [7] Kumar, C. S.; Mohammad, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. **2011**, 63, 789-808.
- [8] Kim, D.-H.;Zeng, H.;Ng, T. C.; Brazel, C. S. T1 and T2 relaxivities of succimer-coated  $MFe_{23}O_4$  ( $M=Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  and  $Co^{2+}$ ) inverse spinel ferrites for potential use as phase-contrast agents in medical MRI. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2009**, 321, 3899-3904.
- [9] Na, H. B.;Song, I. C.; Hyeon, T. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. *Advanced Materials*. **2009**, 21, 2133-2148.
- [10] Comba, F. N.;Rubianes, M. D.;Cabrera, L.;Gutiérrez, S.;Herrasti, P.; Rivas, G. A. Highly sensitive and selective glucose biosensing at carbon paste electrodes modified with

- electrogenerated magnetite nanoparticles and glucose oxidase. *Electroanalysis*. **2010**, *22*, 1566-1572.
- [11] Nanotechnology for Health: Vision paper and basis for a strategic research agenda for nanomedicine. European Technology Platform on Nanomedicine. EC Publication office.
- [12] Amiri, S.; Shokrollahi, H. The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science. *Materials Science and Engineering: C*. **2013**, *33*, 1-8.
- [13] Schultz-Sikma, E. A.; Joshi, H. M.; Ma, Q.; MacRenaris, K. W.; Eckermann, A. L.; Dravid, V. P.; Meade, T. J. Probing the chemical stability of mixed ferrites: Implications for magnetic resonance contrast agent design. *Chemistry of Materials*. **2011**, *23*, 2657-2664.
- [14] Joshi, H. M.; Lin, Y. P.; Aslam, M.; Prasad, P. V.; Schultz-Sikma, E. A.; Edelman, R.; Meade, T.; Dravid, V. P. Effects of shape and size of cobalt ferrite nanostructures on their MRI contrast and thermal activation. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2009**, *113*, 17761-17767.
- [15] Cullity, B. D.; Graham, C. D. In *Introduction to Magnetic Materials*. John Wiley & Sons, Inc., 2008; pp 537-544.
- [16] Andreozzi, G. B.; Princivalle, F.; Skogby, H.; Della Giusta, A. Cation ordering and structural variations with temperature in  $\text{MgAl}_2\text{O}_4$  spinel: An X-ray single-crystal study. *American Mineralogist*. **2000**, *85*, 1164-1171.
- [17] Robbins, M.; Wertheim, G. K.; Sherwood, R. C.; Buchanan, D. N. E. Magnetic properties and site distributions in the system  $\text{FeCr}_2\text{O}_4\text{-Fe}_3\text{O}_4(\text{Fe}^{2+}\text{Cr}_{2-x}\text{Fe}_x^{3+}\text{O}_4)$ . *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. **1971**, *32*, 717-729.
- [18] Carta, D.; Casula, M. F.; Mountjoy, G.; Corrias, A. Formation and cation distribution in supported manganese ferrite nanoparticles: an X-ray absorption study. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2008**, *10*, 3108-3117.
- [19] Carta, D.; Casula, M. F.; Falqui, A.; Loche, D.; Mountjoy, G.; Sangregorio, C.; Corrias, A. A structural and magnetic investigation of the inversion degree in ferrite nanocrystals  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  ( $\text{M} = \text{Mn}, \text{Co}, \text{Ni}$ ). *The Journal of Physical Chemistry C*. **2009**, *113*, 8606-8615.
- [20] Verwey, E. J. W.; Heilmann, E. L. Physical properties and cation arrangement of oxides with spinel structures I. Cation arrangement in spinels. *The Journal of Chemical Physics*. **1947**, *15*, 174-180.

- [21] Guimarães, A. P. *Principles of nanomagnetism*; Springer Science & Business Media, 2009.
- [22] Rezlescu, N.;Istrate, S.;Rezlescu, E.; Luca, E. Cation distribution and Curie temperature in ferrites. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. **1974**, 35, 43-46.
- [23] Franco, A.; e Silva, F. C. High temperature magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles. *Applied Physics Letters*. **2010**, 96, 172505.
- [24] Tang, Z. X.;Sorensen, C. M.;Klabunde, K. J.; Hadjipanayis, G. C. Size-dependent Curie temperature in nanoscale  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  particles. *Physical Review Letters*. **1991**, 67, 3602-3605.
- [25] Torres, T. E.;Roca, A. G.;Morales, M. P.;Ibarra, A.;Marquina, C.;Ibarra, M. R.; Goya, G. F. Magnetic properties and energy absorption of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Journal of Physics: Conference Series*. **2010**, 200, 072101.
- [26] Peddis, D.;Yaacoub, N.;Ferretti, M.;Martinelli, A.;Piccaluga, G.;Musinu, A.;Cannas, C.;Navarra, G.;Greneche, J. M.; Fiorani, D. Cationic distribution and spin canting in  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles. *Journal of Physics: Condensed Matter*. **2011**, 23, 426004.
- [27] Blanco-Gutiérrez, V.;Gallastegui, J. A.;Bonville, P.;Torralvo-Fernández, M. J.; Sáez-Puche, R.  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (M:  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ) nanoparticles: Mössbauer and X-ray absorption spectroscopies studies and high-temperature superparamagnetic behavior. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2012**, 116, 24331-24339.
- [28] Daou, T. J.;Pourroy, G.;Begin-Colin, S.;Greneche, J. M.;Ulhaq-Bouillet, C.;Legare, P.;Bernhardt, P.;Leuvrey, C.; Rogez, G. Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles. *Chemistry of Materials*. **2006**, 18, 4399-4404.
- [29] Sun, J.;Zhou, S. B.;Hou, P.;Yang, Y.;Weng, J.;Li, X. H.; Li, M. Y. Synthesis and characterization of biocompatible  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **2007**, 80A, 333-341.
- [30] Taboada, E.;Rodriguez, E.;Roig, A.;Oro, J.;Roch, A.; Muller, R. N. Relaxometric and magnetic characterization of ultrasmall iron oxide nanoparticles with high magnetization. Evaluation as potential T-1 magnetic resonance imaging contrast agents for molecular imaging. *Langmuir*. **2007**, 23, 4583-4588.
- [31] Sharifi, I.;Shokrollahi, H.; Amiri, S. Ferrite-based magnetic nanofluids used in hyperthermia applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2012**, 324, 903-915.

- [32] Sabale, S.;Jadhav, V.;Khot, V.;Zhu, X.;Xin, M.; Chen, H. Superparamagnetic  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (M=Ni, Co, Zn, Mn) nanoparticles: synthesis, characterization, induction heating and cell viability studies for cancer hyperthermia applications. *Journal of materials science. Materials in medicine*. **2015**, 26, 5466.
- [33] Xing, R. M.;Lu, L.;Huang, H. P.;Liu, S. H.; Niu, J. Y. Facile synthesis of carboxylic functionalized  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (M = Mn, Co, Zn) nanospheres. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **2015**, 15, 5175-5179.
- [34] Tartaj, P.;Morales, M. P.;Veintemillas-Verdaguer, S.;Gonzalez-Carreño, T.; Serna, C. J. chapter 5: Synthesis, properties and biomedical applications of magnetic nanoparticles. In *Handbook of Magnetic Materials*. K. H. J. Buschow, Ed.; Elsevier, 2006; pp 403-482.
- [35] Kim, Y. I.;Kim, D.; Lee, C. S. Synthesis and characterization of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  magnetic nanoparticles prepared by temperature-controlled coprecipitation method. *Physica B: Condensed Matter*. **2003**, 337, 42-51.
- [36] Qu, Y.;Yang, H.;Yang, N.;Fan, Y.;Zhu, H.; Zou, G. The effect of reaction temperature on the particle size, structure and magnetic properties of coprecipitated  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles. *Materials Letters*. **2006**, 60, 3548-3552.
- [37] Gao, Q.;Hong, G.;Ni, J.;Wang, W.;Tang, J.; He, J. Uniaxial anisotropy and novel magnetic behaviors of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles prepared in a magnetic field. *Journal of Applied Physics*. **2009**, 105, 07A516.
- [38] Morais, P.;Santos, R.;Pimenta, A.;Azevedo, R.; Lima, E. Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles. *Thin solid films*. **2006**, 515, 266-270.
- [39] Fu, W.;Yang, H.;Li, M.;Li, M.;Yang, N.; Zou, G. Anatase  $\text{TiO}_2$  nanolayer coating on cobalt ferrite nanoparticles for magnetic photocatalyst. *Materials Letters*. **2005**, 59, 3530-3534.
- [40] Tartaj, P.;del Puerto Morales, M.;Veintemillas-Verdaguer, S.;Gonzalez-Carreno, T.; Serna, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*. **2003**, 36, R182.
- [41] Pileni, M. P. Reverse micelles as microreactors. *The Journal of Physical Chemistry*. **1993**, 97, 6961-6973.

- [42] Gyergyek, S.;Makovec, D.;Kodre, A.;Arčon, I.;Jagodič, M.; Drofenik, M. Influence of synthesis method on structural and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles. *J Nanopart Res.* **2010**, *12*, 1263-1273.
- [43] Liu, C.;Rondinone, A. J.; Zhang, Z. J. Synthesis of magnetic spinel ferrite  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles from ferric salt and characterization of the size-dependent superparamagnetic properties. *Pure and applied chemistry.* **2000**, *72*, 37-45.
- [44] Liu, C.;Zou, B. S.;Rondinone, A. J.; Zhang, J. Chemical control of superparamagnetic properties of magnesium and cobalt spinel ferrite nanoparticles through atomic level magnetic couplings. *Journal of the American Chemical Society.* **2000**, *122*, 6263-6267.
- [45] Moumen, N.; Pileni, M. P. Control of the size of cobalt ferrite magnetic fluid. *The Journal of Physical Chemistry.* **1996**, *100*, 1867-1873.
- [46] Rondinone, A. J.;Samia, A. C. S.; Zhang, Z. J. Superparamagnetic relaxation and magnetic anisotropy energy distribution in  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  spinel ferrite nanocrystallites. *The Journal of Physical Chemistry B.* **1999**, *103*, 6876-6880.
- [47] Sun, S.;Zeng, H.;Robinson, D. B.;Raoux, S.;Rice, P. M.;Wang, S. X.; Li, G. Monodisperse  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society.* **2003**, *126*, 273-279.
- [48] Park, J.;An, K.;Hwang, Y.;Park, J.-G.;Noh, H.-J.;Kim, J.-Y.;Park, J.-H.;Hwang, N.-M.; Hyeon, T. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nat Mater.* **2004**, *3*, 891-895.
- [49] Andreu, I.;Natividad, E.;Solozábal, L.; Roubreau, O. Same magnetic nanoparticles, different heating behavior: Influence of the arrangement and dispersive medium. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* **2015**, *380*, 341-346.
- [50] Davies, K. J.;Wells, S.;Upadhyay, R. V.;Charles, S. W.;O'Grady, K.;El Hilo, M.;Meaz, T.; Mørup, S. The observation of multi-axial anisotropy in ultrafine cobalt ferrite particles used in magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* **1995**, *149*, 14-18.
- [51] Yáñez-Vilar, S.;Sánchez-Andújar, M.;Gómez-Aguirre, C.;Mira, J.;Señarís-Rodríguez, M. A.; Castro-García, S. A simple solvothermal synthesis of  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (M=Mn, Co and Ni) nanoparticles. *Journal of Solid State Chemistry.* **2009**, *182*, 2685-2690.
- [52] Hu, C.;Gao, Z.; Yang, X. One-pot low temperature synthesis of  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (M=Co, Ni, Zn) superparamagnetic nanocrystals. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* **2008**, *320*, L70-L73.

- [53] Zhao, D.;Wu, X.;Guan, H.; Han, E. Study on supercritical hydrothermal synthesis of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles. *The Journal of Supercritical Fluids*. **2007**, *42*, 226-233.
- [54] Baldi, G.;Bonacchi, D.;Innocenti, C.;Lorenzi, G.; Sangregorio, C. Cobalt ferrite nanoparticles: The control of the particle size and surface state and their effects on magnetic properties. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2007**, *311*, 10-16.
- [55] Branka Babić-Stojić;Vukoman Jokanović;Dušan Milivojević;Zvonko Jagličić;Darko Makovec;Nataša Jović; Marinović-Cincović<sup>1</sup>, a. M. Magnetic and structural studies of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles suspended in an organic liquid. *Journal of Nanomaterials*. **2013**, *2013*, 9.
- [56] Ammar, S.;Helfen, A.;Jouini, N.;Fievet, F.;Rosenman, I.;Villain, F.;Molinie, P.; Danot, M. Magnetic properties of ultrafine cobalt ferrite particles synthesized by hydrolysis in a polyol medium. *Journal of Materials Chemistry*. **2001**, *11*, 186-192.
- [57] Scheinberg, D. A.;Villa, C. H.;Escorcia, F. E.; McDevitt, M. R. Conscripts of the infinite armada: systemic cancer therapy using nanomaterials. *Nat Rev Clin Oncol*. **2010**, *7*, 266-276.
- [58] Bardhan, R.;Chen, W.;Bartels, M.;Perez-Torres, C.;Botero, M. F.;McAninch, R. W.;Contreras, A.;Schiff, R.;Pautler, R. G.;Halas, N. J.; Joshi, A. Tracking of multimodal therapeutic nanocomplexes targeting breast cancer in vivo. *Nano letters*. **2010**, *10*, 4920-4928.
- [59] Dixit, V.;Van den Bossche, J.;Sherman, D. M.;Thompson, D. H.; Andres, R. P. Synthesis and grafting of thioctic acid-PEG-folate conjugates onto Au nanoparticles for selective targeting of folate receptor-positive tumor cells. *Bioconjug Chem*. **2006**, *17*, 603-609.
- [60] Ferrari, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. **2005**, *5*, 161-171.
- [61] Chouly, C.;Pouliquen, D.;Lucet, I.;Jeune, J. J.; Jallet, P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *Journal of microencapsulation*. **1996**, *13*, 245-255.
- [62] Semmler-Behnke, M.;Kreyling, W. G.;Lipka, J.;Fertsch, S.;Wenk, A.;Takenaka, S.;Schmid, G.; Brandau, W. Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. *Small*. **2008**, *4*, 2108-2111.
- [63] Owens Iii, D. E.; Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. **2006**, *307*, 93-102.



- [64] Liu, Z.;Cai, W.;He, L.;Nakayama, N.;Chen, K.;Sun, X.;Chen, X.; Dai, H. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nat Nano*. **2007**, 2, 47-52.
- [65] Choi, H. S.;Liu, W.;Misra, P.;Tanaka, E.;Zimmer, J. P.;Ipe, B. I.;Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. Renal clearance of nanoparticles. *Nature biotechnology*. **2007**, 25, 1165-1170.
- [66] Peer, D.;Karp, J. M.;Hong, S.;Farokhzad, O. C.;Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nano*. **2007**, 2, 751-760.
- [67] Maeda, H.;Wu, J.;Sawa, T.;Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*. **2000**, 65, 271-284.
- [68] Veisheh, O.;Gunn, J. W.; Zhang, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced drug delivery reviews*. **2010**, 62, 284-304.
- [69] Nam, J.;Won, N.;Bang, J.;Jin, H.;Park, J.;Jung, S.;Jung, S.;Park, Y.; Kim, S. Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy. *Advanced drug delivery reviews*. **2013**, 65, 622-648.
- [70] Conner, S. D.; Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. **2003**, 422, 37-44.
- [71] Pujals, S.;Fernández-Carneado, J.;López-Iglesias, C.;Kogan, M. J.; Giralt, E. Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: Relevance of CPP self-assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **2006**, 1758, 264-279.
- [72] Cho, E. C.;Xie, J.;Wurm, P. A.; Xia, Y. Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant. *Nano letters*. **2009**, 9, 1080-1084.
- [73] Chithrani, B. D.;Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters*. **2006**, 6, 662-668.
- [74] Yu, M. K.;Park, J.; Jon, S. Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics*. **2012**, 2, 3.
- [75] Curtis, J.;Greenberg, M.;Kester, J.;Phillips, S.; Krieger, G. Nanotechnology and nanotoxicology. *Toxicol Rev*. **2006**, 25, 245-260.



- [76] Murphy, C. J.;Gole, A. M.;Stone, J. W.;Sisco, P. N.;Alkilany, A. M.;Goldsmith, E. C.; Baxter, S. C. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. *Accounts of chemical research*. **2008**, *41*, 1721-1730.
- [77] Goodman, C. M.;McCusker, C. D.;Yilmaz, T.; Rotello, V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry*. **2004**, *15*, 897-900.
- [78] Lewinski, N.;Colvin, V.; Drezek, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*. **2008**, *4*, 26-49.
- [79] Mahmoudi, M.;Laurent, S.;Shokrgozar, M. A.; Hosseinkhani, M. Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Cell “vision” versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS nano*. **2011**, *5*, 7263-7276.
- [80] Buyukhatipoglu, K.; Clyne, A. M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **2011**, *96A*, 186-195.
- [81] Cherukuri, P.;Glazer, E. S.; Curley, S. A. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*. **2010**, *62*, 339-345.
- [82] Goldstein, L.;Dewhirst, M.;Repacholi, M.; Kheifets, L. Summary, conclusions and recommendations: adverse temperature levels in the human body. *International Journal of Hyperthermia*. **2003**, *19*, 373-384.
- [83] Kulshrestha, P.;Gogoi, M.;Bahadur, D.; Banerjee, R. In vitro application of paclitaxel loaded magnetoliposomes for combined chemotherapy and hyperthermia. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2012**, *96*, 1-7.
- [84] Alvarez-Berríos, M. P.;Castillo, A.;Méndez, J.;Soto, O.;Rinaldi, C.; Torres-Lugo, M. Hyperthermic potentiation of cisplatin by magnetic nanoparticle heaters is correlated with an increase in cell membrane fluidity. *International journal of nanomedicine*. **2013**, *8*, 1003.
- [85] Sato, A.;Tamura, Y.;Sato, N.;Yamashita, T.;Takada, T.;Sato, M.;Osai, Y.;Okura, M.;Ono, I.;Ito, A.;Honda, H.;Wakamatsu, K.;Ito, S.; Jimbow, K. Melanoma-targeted chemo-thermo-immuno (CTI)-therapy using N-propionyl-4-S-cysteaminyphenol-magnetite nanoparticles elicits CTL response via heat shock protein-peptide complex release. *Cancer science*. **2010**, *101*, 1939-1946.
- [86] Rodriguez-Luccioni, H. L.;Latorre-Esteves, M.;Mendez-Vega, J.;Soto, O.;Rodriguez, A. R.;Rinaldi, C.; Torres-Lugo, M. Enhanced reduction in cell viability by hyperthermia

- induced by magnetic nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. **2011**, *6*, 373-380.
- [87] Sadhukha, T.;Niu, L.;Wiedmann, T. S.; Panyam, J. Effective Elimination of Cancer Stem Cells by Magnetic Hyperthermia. *Molecular Pharmaceutics*. **2013**, *10*, 1432-1441.
- [88] Villanueva, A.;De La Presa, P.;Alonso, J.;Rueda, T.;Martinez, A.;Crespo, P.;Morales, M.;Gonzalez-Fernandez, M.;Valdes, J.; Rivero, G. Hyperthermia HeLa cell treatment with silica-coated manganese oxide nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2010**, *114*, 1976-1981.
- [89] Creixell, M.;Bohórquez, A. C.;Torres-Lugo, M.; Rinaldi, C. EGFR-Targeted magnetic nanoparticle heaters kill cancer cells without a perceptible temperature rise. *ACS nano*. **2011**, *5*, 7124-7129.
- [90] Asin, L.;Goya, G. F.;Tres, A.; Ibarra, M. R. Induced cell toxicity originates dendritic cell death following magnetic hyperthermia treatment. *Cell death & disease*. **2013**, *4*, e596.
- [91] Carrey, J.;Connord, V.; Respaud, M. Ultrasound generation and high-frequency motion of magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field: Toward intracellular ultrasound therapy?. *Applied Physics Letters*. **2013**, *102*, 232404.
- [92] Alexis, F.;Rhee, J. W.;Richie, J. P.;Radovic-Moreno, A. F.;Langer, R.; Farokhzad, O. C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urologic oncology*. **2008**, *26*, 74-85.
- [93] Raaphorst, G. P.;Freeman, M. L.; Dewey, W. C. Radiosensitivity and recovery from radiation damage in cultured CHO cells exposed to hyperthermia at 42.5 or 45.5 degrees C. *Radiation research*. **1979**, *79*, 390-402.
- [94] Polo-Corrales, L.; Rinaldi, C. Monitoring iron oxide nanoparticle surface temperature in an alternating magnetic field using thermoresponsive fluorescent polymers. *Journal of Applied Physics*. **2012**, *111*, 07B334.
- [95] Riedinger, A.;Guardia, P.;Curcio, A.;Garcia, M. A.;Cingolani, R.;Manna, L.; Pellegrino, T. Subnanometer local temperature probing and remotely controlled drug release based on Azo-Functionalized iron oxide nanoparticles. *Nano letters*. **2013**, *13*, 2399-2406.
- [96] Dias, J. T.;Moros, M.;del Pino, P.;Rivera, S.;Grazú, V.; de la Fuente, J. M. DNA as a molecular local thermal probe for the analysis of magnetic hyperthermia. *Angewandte Chemie International Edition*. **2013**, *52*, 11526-11529.

- [97] Arelaro, A. D.; Lima Jr, E.; Rossi, L. M.; Kiyohara, P. K.; Rechenberg, H. R. Ion dependence of magnetic anisotropy in  $MFe_2O_4$  ( $M = Fe, Co, Mn$ ) nanoparticles synthesized by high-temperature reaction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2008**, *320*, e335-e338.
- [98] Lima, E.; De Biasi, E.; Mansilla, M. V.; Saleta, M. E.; Effenberg, F.; Rossi, L. M.; Cohen, R.; Rechenberg, H. R.; Zysler, R. D. Surface effects in the magnetic properties of crystalline 3 nm ferrite nanoparticles chemically synthesized. *Journal of Applied Physics*. **2010**, *108*, 103919.
- [99] Marcos-Campos, I.; Asín, L.; Torres, T. E.; Marquina, C.; Tres, A.; Ibarra, M. R.; Goya, G. F. Cell death induced by the application of alternating magnetic fields to nanoparticle-loaded dendritic cells. *Nanotechnology*. **2011**, *22*, 205101.
- [100] Fortin, J.-P.; Gazeau, F.; Wilhelm, C. Intracellular heating of living cells through Néel relaxation of magnetic nanoparticles. *Eur Biophys J*. **2008**, *37*, 223-228.
- [101] Lima, E., Jr.; De Biasi, E.; Zysler, R.; Vasquez Mansilla, M.; Mojica-Pisciotti, M.; Torres, T.; Calatayud, M. P.; Marquina, C.; Ricardo Ibarra, M.; Goya, G. Relaxation time diagram for identifying heat generation mechanisms in magnetic fluid hyperthermia. *J Nanopart Res*. **2014**, *16*, 1-11.
- [102] Martinez-Boubeta, C.; Simeonidis, K.; Makridis, A.; Angelakeris, M.; Iglesias, O.; Guardia, P.; Cabot, A.; Yedra, L.; Estradé, S.; Peiró, F. Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications. *Scientific reports*. **2013**, *3*.
- [103] Gonzalez-Fernandez, M.; Torres, T.; Andrés-Vergés, M.; Costo, R.; De la Presa, P.; Serna, C.; Morales, M.; Marquina, C.; Ibarra, M.; Goya, G. Magnetic nanoparticles for power absorption: Optimizing size, shape and magnetic properties. *Journal of Solid State Chemistry*. **2009**, *182*, 2779-2784.
- [104] Hugounenq, P.; Levy, M.; Alloyeau, D.; Lartigue, L.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Ricolleau, C.; Roux, S.; Wilhelm, C.; Gazeau, F.; Bazzi, R. Iron oxide monocrystalline nanoflowers for highly efficient magnetic hyperthermia. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2012**, *116*, 15702-15712.
- [105] Fortin, J. P.; Wilhelm, C.; Servais, J.; Menager, C.; Bacri, J. C.; Gazeau, F. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *J Am Chem Soc*. **2007**, *129*, 2628-2635.

- [106] Fantechi, E.;Innocenti, C.;Albino, M.;Lottini, E.; Sangregorio, C. Influence of cobalt doping on the hyperthermic efficiency of magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2015**, *380*, 365-371.
- [107] de Sousa, M. E.;Fernández van Raap, M. B.;Rivas, P. C.;Mendoza Zélis, P.;Girardin, P.;Pasquevich, G. A.;Alessandrini, J. L.;Muraca, D.; Sánchez, F. H. Stability and relaxation mechanisms of citric acid coated magnetite nanoparticles for magnetic hyperthermia. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2013**, *117*, 5436-5445.
- [108] Salafranca, J.;Gazquez, J.;Pérez, N.;Labarta, A.;Pantelides, S. T.;Pennycook, S. J.;Batlle, X.; Varela, M. Surfactant organic molecules restore magnetism in metal-oxide nanoparticle surfaces. *Nano letters*. **2012**, *12*, 2499-2503.
- [109] Pankhurst, Q. A.;Connolly, J.;Jones, S.; Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*. **2003**, *36*, R167.
- [110] Qiao, R.;Yang, C.; Gao, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. *Journal of Materials Chemistry*. **2009**, *19*, 6274-6293.
- [111] Koenig, S. H.; Kellar, K. E. Theory of  $1/T_1$  and  $1/T_2$  NMRD profiles of solutions of magnetic nanoparticles. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. **1995**, *34*, 227-233.
- [112] Park, J.;Lee, E.;Hwang, N.-M.;Kang, M.;Kim, S. C.;Hwang, Y.;Park, J.-G.;Noh, H.-J.;Kim, J.-Y.;Park, J.-H.; Hyeon, T. One-Nanometer-Scale Size-Controlled synthesis of monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*. **2005**, *44*, 2872-2877.
- [113] Weissleder, R.;Bogdanov, A.; Papisov, M. Drug targeting in magnetic resonance imaging. *Magnetic resonance quarterly*. **1992**, *8*, 55-63.
- [114] Bulte, J. W.; Kraitichman, D. L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR in Biomedicine*. **2004**, *17*, 484-499.
- [115] Thorek, D. L.;Chen, A. K.;Czupryna, J.; Tsourkas, A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Annals of biomedical engineering*. **2006**, *34*, 23-38.
- [116] Lin, M. M.;Kim, D. K.;El Haj, A. J.; Dobson, J. Development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) for translation to clinical applications. *NanoBioscience, IEEE Transactions on*. **2008**, *7*, 298-305.

- [117] Morales, M.;Veintemillas-Verdaguer, S.;Montero, M.;Serna, C.;Roig, A.;Casas, L.;Martinez, B.; Sandiumenge, F. Surface and internal spin canting in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Chemistry of Materials*. **1999**, *11*, 3058-3064.
- [118] Yee, C.;Kataby, G.;Ulman, A.;Prozorov, T.;White, H.;King, A.;Rafailovich, M.;Sokolov, J.; Gedanken, A. Self-assembled monolayers of alkanesulfonic and-phosphonic acids on amorphous iron oxide nanoparticles. *Langmuir*. **1999**, *15*, 7111-7115.
- [119] Jun, Y.-w.;Huh, Y.-M.;Choi, J.-s.;Lee, J.-H.;Song, H.-T.;KimKim;Yoon, S.;Kim, K.-S.;Shin, J.-S.;Suh, J.-S.; Cheon, J. Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for cancer diagnosis via magnetic resonance imaging. *Journal of the American Chemical Society*. **2005**, *127*, 5732-5733.
- [120] Maenosono, S.;Suzuki, T.; Saita, S. Superparamagnetic FePt nanoparticles as excellent MRI contrast agents. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2008**, *320*, L79-L83.
- [121] Seo, W. S.;Lee, J. H.;Sun, X.;Suzuki, Y.;Mann, D.;Liu, Z.;Terashima, M.;Yang, P. C.;McConnell, M. V.; Nishimura, D. G. FeCo/graphitic-shell nanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and near-infrared agents. *Nature materials*. **2006**, *5*, 971-976.
- [122] Shultz, M. D.;Calvin, S.;Fatouros, P. P.;Morrison, S. A.; Carpenter, E. E. Enhanced ferrite nanoparticles as MRI contrast agents. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2007**, *311*, 464-468.
- [123] Tromsdorf, U. I.;Bigall, N. C.;Kaul, M. G.;Bruns, O. T.;Nikolic, M. S.;Mollwitz, B.;Sperling, R. A.;Reimer, R.;Hohenberg, H.;Parak, W. J.;Förster, S.;Beisiegel, U.;Adam, G.; Weller, H. Size and surface effects on the MRI relaxivity of manganese ferrite nanoparticle contrast agents. *Nano letters*. **2007**, *7*, 2422-2427.
- [124] Lee, J.-H.;Huh, Y.-M.;Jun, Y.-w.;Seo, J.-w.;Jang, J.-t.;Song, H.-T.;Kim, S.;Cho, E.-J.;Yoon, H.-G.;Suh, J.-S.; Cheon, J. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat. Med*. **2007**, *13*, 95-99.
- [125] Mazarío, E.;Sánchez-Marcos, J.;Menéndez, N.;Cañete, M.;Mayoral, A.;Rivera-Fernández, S.;de la Fuente, J. M.; Herrasti, P. High specific absorption rate and transverse relaxivity effects in manganese ferrite nanoparticles obtained by an electrochemical route. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2015**, 10.1021/jp510937r.

- [126] Hu, F. Q.;Wei, L.;Zhou, Z.;Ran, Y. L.;Li, Z.; Gao, M. Y. Preparation of biocompatible magnetite nanocrystals for In vivo magnetic resonance detection of cancer. *Advanced Materials*. **2006**, *18*, 2553-2556.
- [127] Arbab, A. S.;Wilson, L. B.;Ashari, P.;Jordan, E. K.;Lewis, B. K.; Frank, J. A. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed*. **2005**, *18*, 383-389.
- [128] Laskar, A.;Ghosh, M.;Khattak, S. I.;Li, W.; Yuan, X. M. Degradation of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-induced ferritin by lysosomal cathepsins and related immune response. *Nanomedicine (London, England)*. **2012**, *7*, 705-717.
- [129] Soenen, S. J. H.;Himmelreich, U.;Nuytten, N.;Pisanic, T. R.;Ferrari, A.; De Cuyper, M. Intracellular nanoparticle coating stability determines nanoparticle diagnostics efficacy and cell functionality. *Small*. **2010**, *6*, 2136-2145.



# Capítulo 2

## OBJETIVOS





Los objetivos de la presente tesis doctoral, se pueden clasificar en:

- Desarrollo de un **método de síntesis** de ferritas de cobalto estequiométricas mediante la electrooxidación de láminas metálicas de hierro y cobalto. Para la consecución de este objetivo se variarán parámetros de síntesis como: la relación de corrientes aplicadas a cada metal, la velocidad de agitación de la disolución, la disposición de ánodos y cátodos en la celda, el área de los electrodos y la temperatura de síntesis.
- **Caracterización estructural y magnética** de las ferritas de cobalto de composición estequiométrica utilizando las técnicas más comunes como DSC, TGA, TXRF, SQUID, DRX, TEM. Mediante el empleo de técnicas más específicas, como Absorción de rayos X, Difracción de neutrones y Espectroscopia Mössbauer se obtendrá mayor conocimiento acerca de la estructura cristalina (posiciones y factores de ocupación de los átomos en la red, vacantes de oxígeno, parámetros de red, etc.), y estructura magnética (momentos magnéticos de cada posición, temperatura de Néel).
- **Funcionalización de las ferritas de cobalto estequiométricas** con compuestos orgánicos que les confieran estabilidad en medio acuoso, como el ácido cítrico (AC) y el ácido fólico (AF).
- Evaluación de la **toxicidad celular** de las ferritas estequiométricas funcionalizadas con AC y AF mediante el método MTT, en función de diversos parámetros como tipo de línea celular, TH, tiempo de incubación y concentración. Complementándose el estudio con el análisis morfológico del citoesqueleto celular.
- Análisis del posible uso de las NPs sintetizadas en el ámbito de la biomedicina, concretamente como **agentes de contraste en resonancia magnética de imagen**, donde se ha estudiado mediante medidas de relajatividad el efecto de la funcionalización de las NPs con AF en la internalización en líneas celulares con receptores de folatos en su superficie y en ausencia de ellos. Por último se ha evaluado la potencia de calor que son capaces de disipar estas NPs cuando se les aplica un campo magnético alterno, para su uso en **hipertermia** y el mecanismo de relajación a través del cual este calor es disipado.



# Capítulo 3

## MATERIALES Y MÉTODOS



# Índice

3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.1	Síntesis Electroquímica de Ferritas de Cobalto .....	63
3.1.1	Efecto del área del cátodo y disposición de los electrodos.....	66
3.1.2	Efecto de la temperatura .....	66
3.1.3	Efecto de la intensidad de corriente sobre ánodo de Fe.....	67
3.1.4	Efecto de la agitación de la disolución.....	67
3.2	Funcionalización de las Nanopartículas .....	67
3.2.1	Recubrimiento con ácido cítrico .....	67
3.2.2	Recubrimiento con ácido fólico.....	68
3.3	Caracterización del Material.....	69
3.3.1	Fluorescencia de rayos X por reflexión total (TXRF) .....	69
3.3.2	Análisis termogravimétrico (TGA) .....	69
3.3.3	Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	70
3.3.4	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de fourier (FTIR).....	70
3.3.5	Microscopia electrónica de transmisión (TEM) .....	71
3.3.6	Medidas magnéticas (SQUID) .....	71
3.3.7	Métodos de difracción.....	72
3.3.7.1	Software de análisis .....	73
3.3.7.2	Equipos de difracción utilizados.....	74
3.3.8	Espectroscopia mössbauer .....	75
3.3.9	Espectroscopia de absorción de rayos X (XANES).....	78
3.3.10	Caracterización coloidal.....	79
3.3.10.1	Tamaño hidrodinámico (TH) .....	79
3.3.10.2	Potencial zeta.....	80
3.4	Aplicaciones Biomédicas.....	82
3.4.1	Hipertermia.....	82
3.4.1.1	Equipo de hipertermia - Toulouse .....	83
3.4.1.2	Equipo de hipertermia – Nanotherics .....	84
3.4.2	Relaxometría por resonancia magnética nuclear .....	84
3.4.3	Imagen por resonancia magnética <i>in vitro</i> .....	85
3.5	Ensayos biológicos.....	85
3.5.1	Líneas celulares utilizadas .....	86
3.5.2	Estudios de citotoxicidad: MTT.....	86
3.5.3	Tinción con azul de toluidina .....	87

3.5.4	Immunofluorescencia indirecta - Tinción del citoesqueleto .....	87
3.5.4.1	Filamentos de actina.....	87
3.5.4.2	Filamentos de tubulina.....	88
3.5.5	Internalización de NPs en células - Ensayos MRI <i>in vitro</i> . ....	88
3.5.6	Microscopio óptico.....	89
Referencias.....		90

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

En este capítulo se describe el método electroquímico diseñado para sintetizar NPs de ferritas de cobalto, así como las técnicas de caracterización que se han empleado en este trabajo y las condiciones en las que se realizaron los análisis. Finalmente, se describen los equipos utilizados en las medidas de hipertermia y de resonancia magnética de imagen.

#### 3.1 Síntesis Electroquímica de Ferritas de Cobalto

La metodología consiste en la producción de iones  $Fe^{3+}$  y  $Co^{2+}$  en disolución acuosa mediante la oxidación, a corriente o potencial controlado, de láminas de Fe y Co empleadas como ánodos. Como cátodo se utiliza una lámina de hierro donde tiene lugar la reducción de agua produciendo iones hidroxilo. El mecanismo de síntesis y las reacciones que tienen lugar en los ánodos y el cátodo, se indican a continuación:

*Reacciones Anódicas:* Oxidación de láminas (ecuaciones 3.1, 3.2, 3.3) y oxidación del agua (ecuación 3.4).



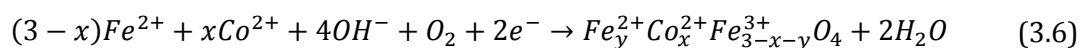


*Reacción catódica:* Reducción del agua (ecuación 3.5)



Los iones  $Fe^{3+}$  y  $Co^{2+}$  generados en los ánodos, alcanzan mediante agitación la superficie del cátodo. En este entorno básico, generado por la reducción del agua, se favorece la formación de hidróxidos y oxihidróxidos de Fe y Co que finalmente acaban siendo reducidos en el cátodo para formar la ferrita de cobalto.

De modo general la ecuación global que describe este proceso se muestra en la ecuación (3.6):



En función de los valores de  $x$  y de  $y$  se pueden obtener ferritas de cobalto de diferente estequiometría. En el caso de ferrita estequiométrica  $y=0$  y  $x=1$ .

La electrosíntesis de nanopartículas de  $CoFe_2O_4$  se llevó a cabo en una celda de vidrio con una capacidad de 100 ml. Como ánodos se emplearon una lámina de Fe de 2 cm<sup>2</sup> (Goodfellow, 99.5% de pureza y de 0.20 mm de espesor), y otra de Co del mismo área (Goodfellow, 99.9% de pureza y de 0.25 mm de espesor). Las láminas de hierro se sustituían después de cada síntesis, mientras que las de cobalto se lijaban y lavaban con agua MilliQ y acetona sucesivas veces con asistencia de ultrasonidos para ser utilizadas en dos ocasiones. Como cátodo, se empleó una lámina de hierro con la misma pureza y espesor que el ánodo de hierro, variando su área según las diferentes disposiciones que se estudiaron, sección 3.1.1, página 66.

El medio electrolítico empleado fue una disolución acuosa 0.04M de Bromuro de tetrabutilamonio ( $nBu_4NBr$ ) (Sigma, 98%), que ya había dado buenos resultados en la electrosíntesis de  $Fe_3O_4$  [1].

Se ha estudiado el efecto de la temperatura de síntesis, así como el efecto de la agitación de la disolución, para lo cual se empleó un calentador-agitador magnético de IKA modelo C-MAG HS-7, como se explicará en las secciones 3.1.2 (página 66) y 3.1.4 (página 67).

La electrooxidación se realizó aplicando diferentes intensidades de corriente ( $I$ ) para la lámina de hierro y se mantuvo en 50 mA en el caso de la lámina de cobalto, (sección 3.1.3, página 67). Las intensidades de corriente fueron aplicadas con un potenciostato/galvanostato Amel 549. Se eligió aplicar intensidad constante y no potencial constante para electrooxidar las láminas ya que implica una velocidad del proceso también constante, mientras que en el caso de fijar el potencial las

variaciones en la resistencia por el consumo del electrodo van a variar la intensidad de corriente generada y por tanto la velocidad del proceso durante la electrosíntesis. También hay que destacar que los valores de intensidad aplicada no fueron excesivamente altos (intensidades de hasta 100 mA), para evitar la reducción de los cationes de Fe/Co en el cátodo y la formación de Fe/Co metálico.

El tiempo de electrosíntesis se fijó en 30 minutos en todos los casos. Finalizada la reacción, el producto obtenido fue separado magnéticamente con un imán de Nb de 0.6 T y lavado sucesivas veces con agua MilliQ. Finalmente el sólido fue separado por centrifugación a 8000 rpm, empleando una centrifuga Hettich Universal 320, y secado a vacío durante 16 h en una estufa a 60 °C para su posterior caracterización en polvo.

Como ya se ha indicado, uno de los objetivos de esta tesis era obtener electroquímicamente la ferrita de cobalto estequiométrica ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ). En ella, la cantidad de Fe por molécula es el doble que la de cobalto, por lo que inicialmente se partió de la suposición de que para liberar iones Fe:Co a la disolución en proporción 2:1 se debería utilizar la misma proporción en las intensidades aplicadas a los electrodos, este valor por tanto se estableció en 100 mA aplicados sobre la lámina de Fe y 50 mA sobre la de cobalto. Posteriormente el resto de parámetros que afectan a la síntesis (temperatura, agitación y geometría) se han ido optimizando para obtener ferritas de cobalto estequiométricas. En la Tabla 1, se muestran las series de síntesis y modificaciones realizadas sobre cada una de ellas en términos de: la disposición y área del cátodo, la separación entre ánodos, el efecto de la intensidad de corriente, la agitación, y la temperatura.

*Tabla 1. Resumen de las variaciones de los parámetros de la síntesis realizados para obtener ferritas estequiométricas y evaluar el efecto de cada parámetro de forma independiente.*

<b>Temperatura (°C)</b>	25	25	25	25	60	60	60	60	80
<b>Agitación (rpm)</b>	1100	1100	1100	1100	1100	700	400	1100	1100
<b>Disposición electrodos</b>	1	2	3	2	2	2	2	2	2
<b>I<sub>Fe</sub> (mA)</b>	100	100	100	80	100	100	100	90	100
<b>Disposición</b>									
<b>Temperatura (°C)</b>									
<b>Efecto de Agitación</b>									
<b>I<sub>Fe</sub> (mA)</b>									
<b>[Fe]/[Co] = 2.0</b>				SI				SI	SI

### 3.1.1 Efecto del área del cátodo y disposición de los electrodos

La electrosíntesis de este material está muy determinada por los parámetros que rodean al proceso electroquímico, siendo uno de los más importantes la separación de los ánodos y cátodo dentro de la celda. Para estudiar este efecto, se realizaron ensayos con tres tipos diferentes de disposición de los electrodos, (Figura 1). Para cada una de las geometrías se fijaron el resto de parámetros: agitación (1100 rpm), intensidad de corriente de oxidación del hierro (100 mA), intensidad de corriente de oxidación del cobalto (50 mA), tiempo de síntesis (30 minutos) y temperatura de trabajo (25 °C), (fila ■ en Tabla 1).

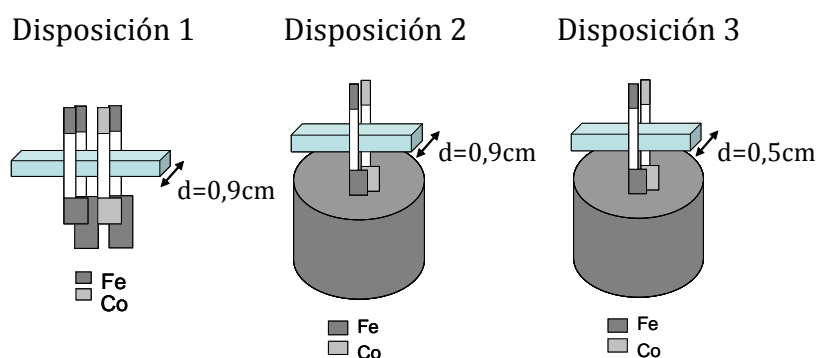


Figura 1. Representación de las tres disposiciones estudiadas de ánodos y cátodos dentro de la celda electroquímica.

En la disposición 1 cada ánodo (Co y Fe) se enfrentó a un cátodo de Fe; en la disposición 2 se empleó un solo cátodo que rodea a ambos ánodos enfrentados entre sí y separados una distancia de 0.9 cm, en la disposición 3 la geometría es idéntica a la disposición 2, pero la separación entre ánodos es de 0.5 cm. Como se mostrará al analizar los resultados (capítulo 4, sección 4.1.1, página 96), la distribución de campo en el dispositivo 1 es menos efectiva que en los dispositivos 2 y 3, ya que las líneas de campo eléctrico en estos últimos casos son uniformes en el ánodo.

### 3.1.2 Efecto de la temperatura

Para estudiar el efecto de la temperatura en la síntesis de ferritas de cobalto, se trabajó con la disposición de ánodos y cátodo número 2 fijando los demás parámetros (Tabla 1, fila ■ ), las temperaturas de trabajo fueron 25, 60 y 80 °C.

### 3.1.3 Efecto de la intensidad de corriente sobre ánodo de Fe.

Este efecto se evaluó para dos temperaturas, 25 °C y 60 °C, fijando también la disposición de ánodos y cátodo número 2 y la agitación en 1100 rpm, y variando la intensidad aplicada al Fe, (Tabla 1, fila ■ ).

### 3.1.4 Efecto de la agitación de la disolución.

Este efecto se estudió a una temperatura de 60 °C, disposición 2 de electrodos y aplicando 100 mA sobre el ánodo de Fe y 50 mA sobre el ánodo de cobalto, los valores de agitación empleados fueron 400, 700 y 1100 rpm, respectivamente, como se resume en la Tabla 1 (fila ■ ).

## 3.2 Funcionalización de las Nanopartículas

Con el fin de estudiar la viabilidad del uso de las nanopartículas en tratamientos de hipertermia y resonancia magnética de imagen, las nanopartículas requieren una posterior etapa de recubrimiento para alcanzar una mayor estabilización en medio acuoso y/o fisiológico. A continuación se describen los diferentes procesos de recubrimiento ensayados, en los que los surfactantes elegidos son recubrimientos de monómeros orgánicos como el ácido cítrico o el ácido fólico, además este último es una molécula de funcionalización específica hacia determinadas líneas celulares.

### 3.2.1 Recubrimiento con ácido cítrico

Para realizar un intercambio de ligando, del tensoactivo de la síntesis ( $n\text{Bu}_4\text{NBr}$ ) por el ácido cítrico (AC), las NPs tras centrifugar se sometieron al procedimiento descrito a continuación: 200 mg de AC se suspenden en 50 ml de agua MiliQ y se ajusta el pH a 5.2 para desprotonar dos de los tres ácidos carboxílicos del AC. Se añade a esta disolución el producto obtenido de una síntesis electroquímica y se calienta a 80 °C durante 1 h con agitación vigorosa. Posteriormente se recupera la fracción magnética con un imán de 0.6 T y se lava sucesivas veces con agua miliQ para eliminar el exceso de ácido cítrico no adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas. A continuación se añade la cantidad de agua necesaria para fijar un valor aproximado de concentración y se sónica el

producto durante media hora para así formar el coloide estable. Finalmente se dializa la suspensión durante 24 h para retirar el ácido cítrico libre[2].

### 3.2.2 Recubrimiento con ácido fólico

Para realizar un intercambio de ligando con ácido fólico (AF), se agitó vigorosamente a 80 °C y durante 1,5 h una disolución de AF y NPs en proporción 10:1 ajustada a pH 8 con KOH. En este pH se encuentra desprotonado uno de los ácidos carboxílicos del AF, que queda libre para unirse a la superficie de la nanopartícula. En la Figura 2, se esquematizan tanto el proceso de síntesis como el posterior recubrimiento con ácido fólico o ácido cítrico que dan lugar a coloides estables en medio acuoso.

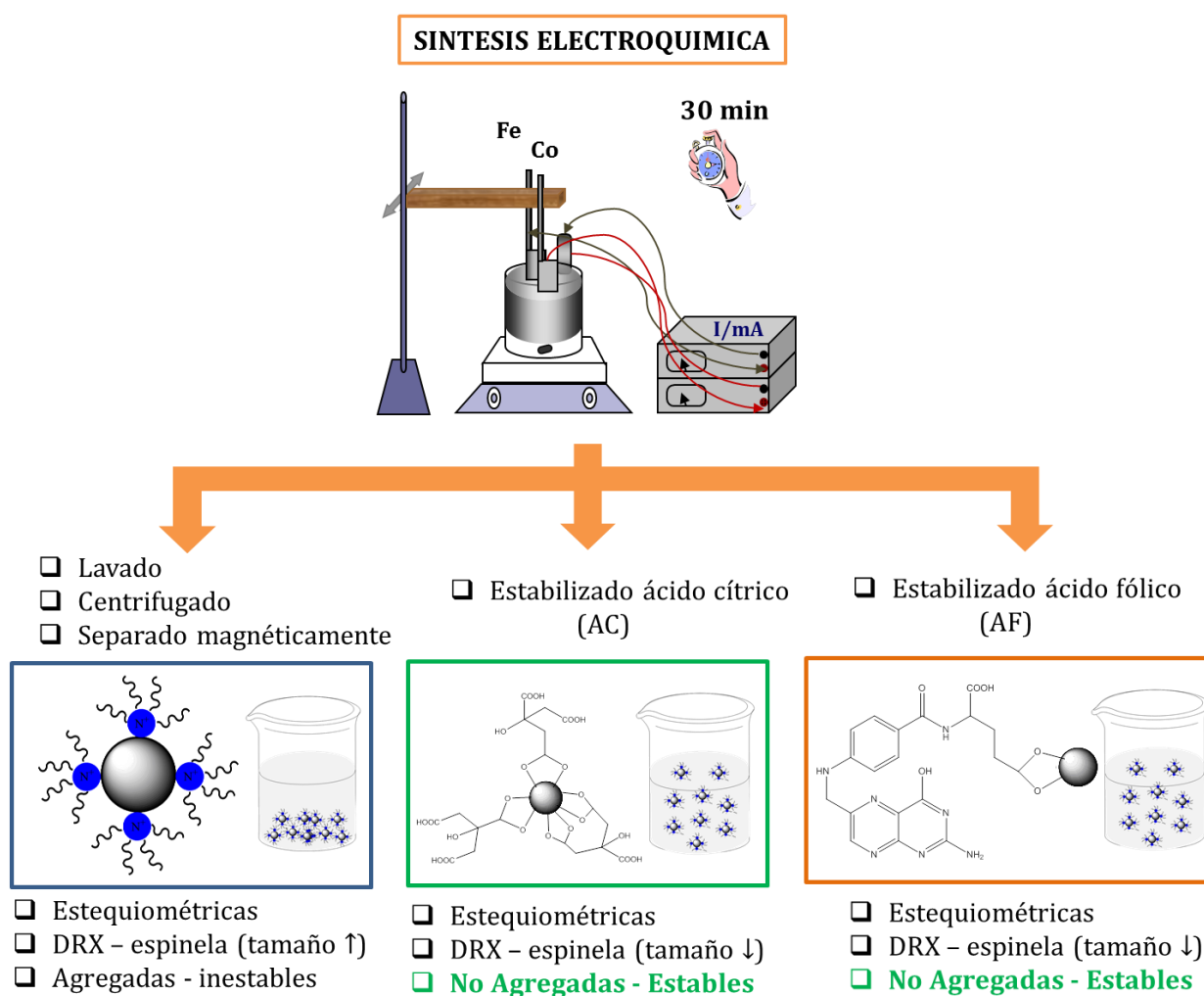


Figura 2. Resumen del proceso de síntesis electroquímica y posterior formación de coloides.

### 3.3 Caracterización del Material

A continuación se dará una breve descripción de porqué se han empleado las diferentes técnicas para la caracterización de los materiales sintetizados y en los casos de técnicas menos habituales se aportará la descripción del fundamento la mismas.

#### 3.3.1 Fluorescencia de rayos X por reflexión total (TXRF)

La relación de iones Fe y Co y la composición cuantitativa de cada una de las muestras, fueron analizadas mediante Fluorescencia de Rayos X por reflexión total (TXRF). La técnica está basada en la excitación de los átomos presentes en la muestra analizada cuando electrones de las capas internas son arrancados por la absorción de un fotón de rayos X. Los electrones de otras capas minimizan la energía del ión formado ocupando los huecos electrónicos que quedan libres, de modo que la energía asociada a dichas transiciones se re-emite en forma de fotones de rayos X. A estas emisiones se las conoce como emisiones de fluorescencia o radiación secundaria y presentan unas energías características del átomo que las genera y una intensidad que depende directamente de la concentración de dichos átomos en la muestra. El resultado es un espectro de dispersión de energía, donde aparecen simultáneamente todas las líneas asociadas a los elementos químicos presentes. El análisis de la energía de la radiación X emitida por la muestra permite identificar los elementos químicos presentes en la misma (análisis cualitativo), integrando cada uno de los perfiles elementales se obtienen sus proporciones másicas (análisis de proporciones másicas) y añadiendo un elemento patrón de concentración conocida se obtiene la cuantificación de dichos elementos (análisis cuantitativo).

Los análisis de TXRF se realizaron con el espectrómetro S2 PicoFox de Bruker Nano GmbH (Alemania), situado en el SIdI de la UAM. Todas las muestras fueron digeridas previamente en medio ácido diluido. Como patrón interno para los análisis cuantitativos se empleó cromo.

#### 3.3.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis de la cantidad de materia orgánica/inorgánica presente en las NPs recubiertas por los diferentes surfactantes fue determinado mediante análisis termogravimétrico. Esta técnica de análisis, mide la cantidad y rapidez del cambio en peso de una muestra en función de la temperatura y/o del tiempo en una atmósfera controlada. De manera general, permite realizar medidas para

determinar la composición de los materiales y predecir su estabilidad a temperaturas de hasta 1500 °C. Esta técnica puede, por tanto, caracterizar materiales que presentan pérdida o ganancia de peso debido a la descomposición, oxidación o deshidratación del material en cuestión. El equipo utilizado fue una Termobalanza TGA Q500 de TA Instruments ubicado en el SIdI (UAM). Las muestras fueron liofilizadas para eliminar los restos de agua de las mismas, y las medidas realizadas bajo atmósfera de nitrógeno (N<sub>2</sub>) o aire aumentando la temperatura a una velocidad de 10 °C/min hasta una temperatura final de 800 °C. Para analizar los datos se representa el porcentaje de masa respecto al peso inicial de la muestra, frente a la temperatura.

### **3.3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La Calorimetría diferencial de barrido se utilizó para determinar la estabilidad de la ferrita de cobalto y la posible presencia de otros compuestos en la muestra, analizando las posibles transiciones de fase.

La técnica consiste en la medida de la diferencia de temperatura entre una muestra y una referencia interna en función del tiempo de calentamiento. La diferencia de temperatura observada se traduce en un flujo de calor, lo que permite medir transiciones endotérmicas y exotérmicas en función de dicha temperatura.

### **3.3.4 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de fourier (FTIR).**

Mediante la espectroscopia de infrarrojos se ha determinado la formación de la ferrita de cobalto, así como la presencia de los surfactantes que recubren las NPs. Se fundamenta en el estudio de la interacción de la radiación electromagnética en el rango infrarrojo, con la materia. La energía infrarroja absorbida por el material provoca cambios entre los estados de energía vibracional, lo que hace posible la caracterización de los principales grupos funcionales de la estructura molecular del compuesto.

El rango espectral de medida utilizado ha sido el IR medio (7000 a 550 cm<sup>-1</sup>). El equipo utilizado ha sido el Espectrofotómetro FT-IR Bruker IFS66v, del SIdI (UAM), con un paso de rango de 4 cm<sup>-1</sup> en todos los casos. La pastilla utilizada para el análisis fue de KBr:NPs, generalmente en proporción 99:1 en masa.

### 3.3.5 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

La forma, el tamaño y la distribución de las NPs se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión (TEM), JEOL JEM1010 (100 KV) ubicado en el SIdI de la UAM y el Microscopio Modelo JEOL 2000 FXII (200 kV) del ICMM (CSIC) equipado con unidad de microanálisis (X-EDS) y cámara CCD. Excepcionalmente se tomaron algunas imágenes de alta resolución utilizando un microscopio Tecnai F30 (FEI), en el Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) de la Universidad de Zaragoza. Presenta una resolución de 1.9 Å, pudiéndose combinar con estudios espectroscópicos EELS (espectroscopia de pérdida de energía de electrón) y STEM-HAADF que proporciona información sobre la composición química con resolución espacial: mapas y perfiles de composición.

Para la visualización de las NPs en el TEM se prepararon suspensiones muy diluidas de las ferritas en agua y se añadió una gota sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono. La muestra se secó al aire antes de ser introducida en el microscopio. Una vez obtenidos las micrografías de las NPs, se midieron más de 100 NPs utilizando el software Image J. La distribución de tamaños se ajustó a una gaussiana, de donde se calculó el tamaño medio de las NPs y la desviación estándar.

### 3.3.6 Medidas magnéticas (SQUID)

La caracterización magnética de las NPs se realizó utilizando un magnetómetro comercial SQUID (*Superconducting quantum interference device*) tipo MPMS-XL-5 T de Quantum Design, localizado en el Instituto de Ciencia de Materiales del CSIC. Este magnetómetro permite caracterizar las propiedades magnéticas de un material con una alta sensibilidad ( $10^{-7}$  emu) y consta básicamente de los siguientes componentes: un sistema de control de temperatura con alta precisión, una bobina superconductora para aplicar un campo magnético externo estable máximo de 5 T y un sistema de detección formado por bobinas de hilo superconductor, que integra un sensor tipo SQUID. Para realizar las medidas de magnetismo de las NPs, éstas se compactaron en una capsula de plástico. En el magnetómetro se han realizado medidas de magnetización (M) frente a temperatura, aplicando campo magnético a la muestra al enfriarla (FC, del inglés *Field Cooling*) y sin aplicar el campo (ZFC, del inglés *Zero Field Cooling*). Para realizar las medidas, la muestra se enfrió desde temperatura ambiente a 10 K en ausencia de campo, y se aplicaron independientemente campos pequeños, de 10, 5, 1, 0.5 y 0.1 kOe y se registró la evolución de la magnetización frente a la temperatura, desde los 5 K hasta  $\approx 400$  K (rama ZFC). Posteriormente, se enfrió la muestra de nuevo hasta los 10 K pero esta vez utilizando el mismo campo magnético que ya estaba aplicado. La magnetización que se registró desde esta temperatura hasta  $\approx 400$  K, manteniendo el campo, es la



rama FC. En la rama FC, los momentos magnéticos de las NPs se enfrían orientados con el campo magnético externo, por lo que el valor de magnetización debería ser constante hasta llegar a la temperatura de bloqueo ( $T_B$ ). Esta  $T_B$  es la temperatura donde ambas ramas coinciden, y en una muestra de NPs con tamaños homogéneos tiene lugar en el máximo de magnetización.

En el magnetómetro también se ha medido el comportamiento de la magnetización de la muestra frente a un campo magnético aplicado máximo de 50 kOe, a 5, 100, 200 y 300 K. A partir de estas curvas se han hallado  $M_s$  (magnetización de saturación),  $M_r$  (magnetización de remanencia) y  $H_c$  (coercitividad).

### 3.3.7 Métodos de difracción

Las técnicas de difracción utilizadas para analizar la estructura cristalina y/o magnética de los materiales sintetizados, fueron la difracción de neutrones (DN) y la difracción de Rayos X (DRX).

Ambas técnicas están basadas en la dispersión elástica de radiación, ya sean rayos X o neutrones. Con el fin de poder observar la estructura, la longitud de onda ( $\lambda$ ) utilizada en ambos casos debe ser similar a las distancias interatómicas del material estudiado, Figura 3. Sin embargo, ambas radiaciones presentan notables diferencias. La principal de ellas, es la naturaleza del haz incidente y por tanto el tipo de interacción radiación-materia que tiene lugar, y en consecuencia, la información que se puede obtener de cada uno de ellas también es sustancialmente diferente.

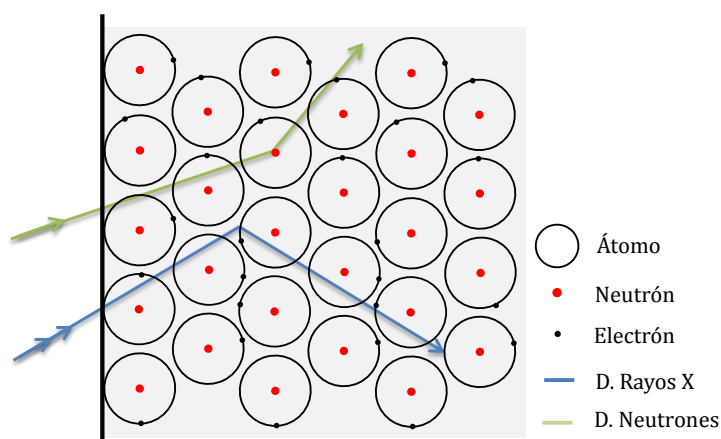


Figura 3. Difracción producida por los Rayos X y los neutrones con la materia.

El haz de Rayos X interacciona fundamentalmente con el campo eléctrico generado por los electrones de los átomos del material, cuanto mayor número de electrones tengan mayor será la interacción, siendo esta directamente proporcional. Este fenómeno implica que mediante difracción de rayos X no sea posible diferenciar elementos contiguos en la tabla periódica o elementos con

pocos electrones. Por otro lado, al incidir un neutrón sobre un átomo no hay interacción con los electrones, al no tratarse de partículas cargadas, y podrá penetrar con facilidad hasta llegar al núcleo con el que interacciona. El factor de dispersión en este caso no es proporcional al número de electrones ni al número de protones ni neutrones que tenga el núcleo por lo que es posible diferenciar átomos con diferente número atómico, aunque estén cerca en la tabla periódica. De hecho, es posible diferenciar átomos en los que el número de neutrones no es igual, como por ejemplo el  $^{57}\text{Fe}$  del  $^{56}\text{Fe}$ . Además, es mucho más fácil detectar los elementos ligeros, incluso el hidrogeno cuando se deuteria el material. Otra propiedad intrínseca de los neutrones es que presentan momento magnético, de modo que en la dispersión también hay que tener en cuenta la interacción magnética dipolar con los electrones desapareados del material. Este hecho implica que la difracción de neutrones además de proporcionarnos información cristalográfica, también resulta ser una herramienta útil para el conocimiento de la estructura magnética del material.

#### **3.3.7.1 Software de análisis**

Los difractogramas tanto de rayos X como de neutrones se analizaron mediante el método de refinamiento de Rietveld[3] con el programa Fullprof suite [4].

El método de Rietveld es una técnica de refinamiento que tiene la capacidad de determinar con precisión parámetros estructurales y/o magnéticos de la muestra a partir de la construcción de un modelo teórico que se ajusta al patrón de difracción experimental mediante el método de mínimos cuadrados y teniendo en cuenta todos los puntos del patrón. En el modelo teórico se incluyen aspectos estructurales tales como: grupo espacial, posición de los átomos en la celda unitaria, concentración de las fases presentes, tamaño de cristal y microdeformaciones, etc... Por último, también se incluye el factor instrumental, el cual contempla el efecto de la óptica del equipo de difracción sobre la medida y cuyo efecto es el ensanchamiento de los picos de difracción. Para iniciar el refinamiento por el método de Rietveld se parte de las ocupaciones teóricas de los diferentes átomos en cada una de sus posiciones, estas se obtuvieron dividiendo la multiplicidad de cada uno de los sitios entre la multiplicidad total del grupo espacial correspondiente ( $Fd\bar{3}m$ ), resultando en las ocupaciones teóricas de una única celdilla unidad. Mediante iteraciones sucesivas se van ajustando los diferentes parámetros que determinan el perfil del difractograma.

### 3.3.7.2 Equipos de difracción utilizados

El equipo de Difracción de Rayos X utilizado fue un Siemens D-5000 con geometría  $\theta/2\theta$ , empleando radiación  $\text{CuK}\alpha = 1.5418 \text{ \AA}$ , equipado con un detector SOL-X Bruker (detector de Si(Li) de dispersión de energías), adecuado para muestras que presentan fluorescencia. La toma de datos se realizó de  $5^\circ$  a  $80^\circ$  en  $2\theta$  con un paso de  $0.04^\circ$ , y 8s/paso, en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la UAM. Para corregir el ensanchamiento instrumental se utiliza Si certificado por la NBS [5] como patrón externo, cuyo difractograma se registra bajo las mismas condiciones que la muestra.

Los equipos de Difracción de Neutrones utilizados, fueron el D1B, (Figura 4) y D2B, (Figura 5), situados en el reactor nuclear de investigación del Instituto Laue-Langevin de Grenoble (Francia). La principal diferencia entre ellos, es la longitud de onda del haz incidente, el flujo y la resolución.

El D1B es un difractómetro de dos ejes de alto flujo de neutrones. Generalmente es utilizado para la determinación de estructuras magnéticas, con elevada resolución espacial a bajos ángulos, donde las reflexiones magnéticas presentan mayor intensidad. Presenta tres monocromadores de grafito pirolítico con  $\lambda$  de  $2.52 \text{ \AA}$ , que aportan un flujo de neutrones de  $6.5 \times 10^6 \text{ ncm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . El ángulo de detección oscila entre  $0.8^\circ$  y  $128.8^\circ$  en  $2\theta$ , permitiendo la toma de datos simultánea en todos los ángulos analizados. Como entorno de muestra, se utilizó un criohorno que nos permitió realizar medidas entre 100 K y 800 K. Para evitar la aparición de la difracción debida a los materiales que componen el criohorno, el D1B incorpora un colimador radial oscilante situado entre el detector y la muestra que evita todas las difracciones que no sean de la muestra en estudio.

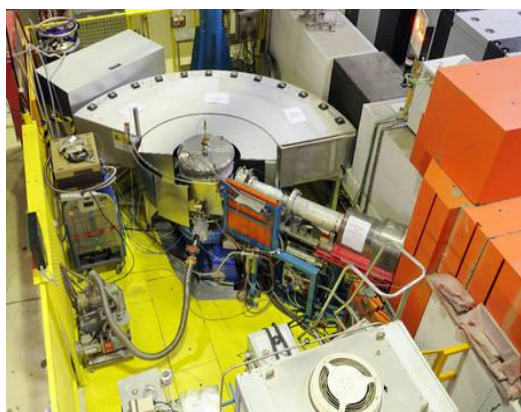
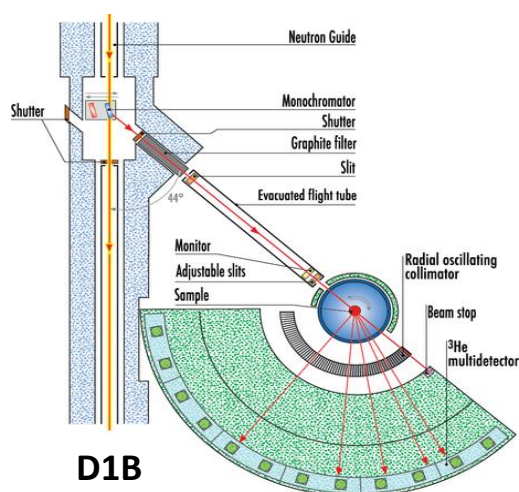


Figura 4. Difractómetro de neutrones, D1B.

El D2B es un difractómetro de ultra alta resolución que se encuentra ubicado en el interior de la cámara del reactor lo que le dota de un alto flujo de neutrones. Está caracterizado por el ángulo que forma el haz difractado por el monocromador primario con la dirección del haz de neutrones incidente, llamado ángulo de retroceso, este valor es muy grande,  $135^\circ$ , lo que proporciona una gran selectividad de las longitudes de onda reflejadas y una gran resolución en los difractogramas. Los patrones de difracción se obtuvieron con una longitud de onda de  $1.594 \text{ \AA}$  en el rango angular de  $10^\circ$  a  $180^\circ$  en  $2\theta$  y para temperaturas de 100 y 800 K, que se alcanzaron gracias a la utilización de un criostato y un horno.

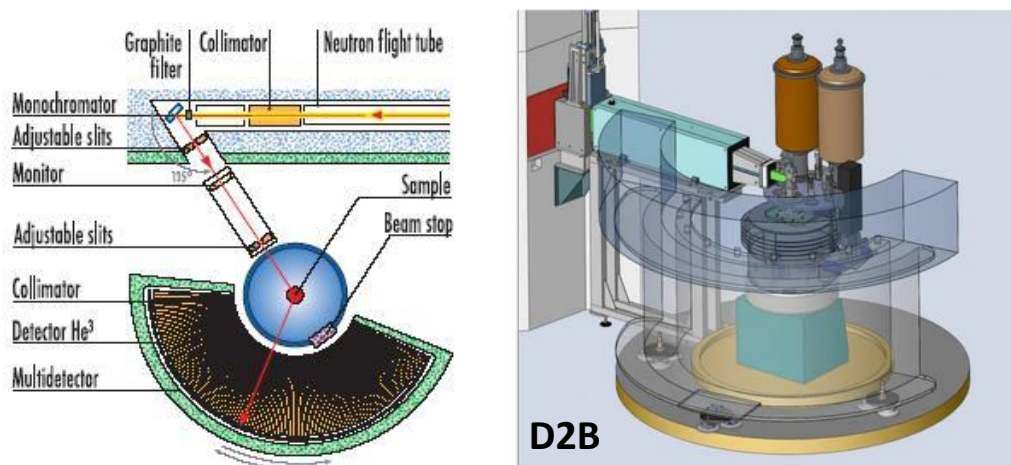


Figura 5. Difractómetro de neutrones, D2B.

### 3.3.8 Espectroscopia mössbauer

El efecto Mössbauer, o fluorescencia nuclear resonante, consiste en la emisión o absorción de fotones y sin transferencia de energía al sólido en el que está inmerso el núcleo implicado. Esta técnica permite analizar en un sólido cuál es el entorno y la microestructura de un isótopo “sonda”, en este trabajo  $^{57}\text{Fe}$ . La fuente de radiación utilizada fue el núcleo radiactivo  $^{57}\text{Co}$ . El  $^{57}\text{Co}$  por captura electrónica, se convierte en  $^{57}\text{Fe}$  en su estado excitado  $I=5/2$ , que puede o bien caer a su estado fundamental ( $I=1/2$ ) emitiendo radiación gamma de 136,3 keV, o bien alcanzar un estado intermedio ( $I=3/2$ ) emitiendo radiación gamma de 122 keV. Seguidamente el núcleo emisor pasa a un estado nuclear no excitado por emisión de radiación y de 14,4 keV (Figura 6). Es esta radiación de 14,4 keV la que mediante modulación por efecto Doppler es susceptible de ser absorbida resonantemente por los núcleos de  $^{57}\text{Fe}$  de la muestra, que se presentan en una escasa proporción en el hierro natural (2,19%). Esta modulación en la energía permite registrar el espectro de absorción de la muestra, y por tanto llevar a cabo el análisis del entorno eléctrico y magnético del núcleo sonda.

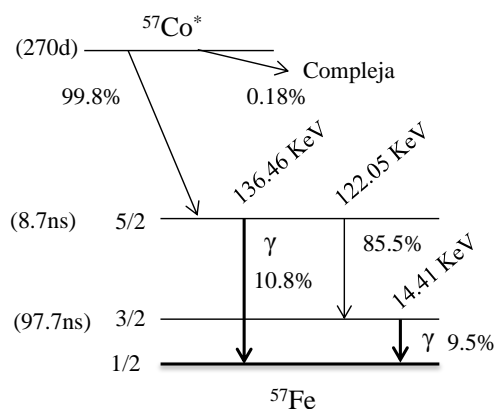


Figura 6. Esquema de desintegración de la fuente radiactiva de  $^{57}\text{Co}$ .

Las interacciones de los momentos de los núcleos resonantes con el campo electromagnético creado por los electrones atómicos propios así como por la red cristalina circundante, da origen a desdoblamiento hiperfino de los niveles nucleares respecto a los que tendría un núcleo aislado, lo cual a su vez origina desdoblamiento y corrimientos en las líneas del espectro de absorción.

En espectroscopia Mössbauer se consideran tres tipos de interacciones hiperfinas: el desplazamiento isomérico ( $\delta$ ), el desdoblamiento cuadrupolar (QS), y el campo magnético hiperfino ( $H_{\text{hf}}$ ) (Figura 7).

El  $\delta$ , es consecuencia de la interacción eléctrica entre la carga nuclear y los electrones s que penetran en el volumen del núcleo, lo que origina una pequeña variación en la energía de sus niveles fundamental y excitado, y proporciona por tanto información acerca de la densidad electrónica del núcleo, por lo que se puede conocer los estados de oxidación del átomo  $^{57}\text{Fe}$ , (Figura 7). Otras variables a considerar además de los cambios de radio nuclear como origen del desplazamiento de los niveles nucleares, y por tanto de la línea de Mössbauer, son la presión y la temperatura.

El QS es consecuencia de la interacción eléctrica del momento cuadrupolar del núcleo y un campo eléctrico inhomogéneo del entorno. Los núcleos con spin  $I = 0$  y  $\frac{1}{2}$  no poseen momento cuadrupolar mientras que con  $I > \frac{1}{2}$ , presenta  $(2I + 1)$  subniveles degenerados. En el caso del  $^{57}\text{Fe}$  la interacción eléctrica cuadrupolar desdobra el primer nivel excitado ( $I = \frac{3}{2}$ ), permaneciendo inalterado el nivel fundamental ( $I = \frac{1}{2}$ ). Este desdoblamiento se pone de manifiesto en un espectro Mössbauer por la presencia de un doblete como resultado de la probabilidad no nula de dos transiciones nucleares (Figura 7). El QS aporta por tanto información acerca de la simetría del campo eléctrico en el entorno nuclear por lo que se puede conocer su coordinación.

El campo magnético hiperfino ( $H_{\text{hf}}$ ), es consecuencia de la interacción entre el momento magnético dipolar del núcleo y un campo magnético cuyo origen puede estar en el átomo mismo, en

los átomos de la red cristalina que le rodean, o ser un campo magnético aplicado externamente. El resultado de esta interacción es el desdoblamiento de los niveles energéticos nucleares  $I > 0$  en  $(2I + 1)$  subniveles igualmente espaciados si no hay interacciones eléctricas cuadrupolares combinadas.

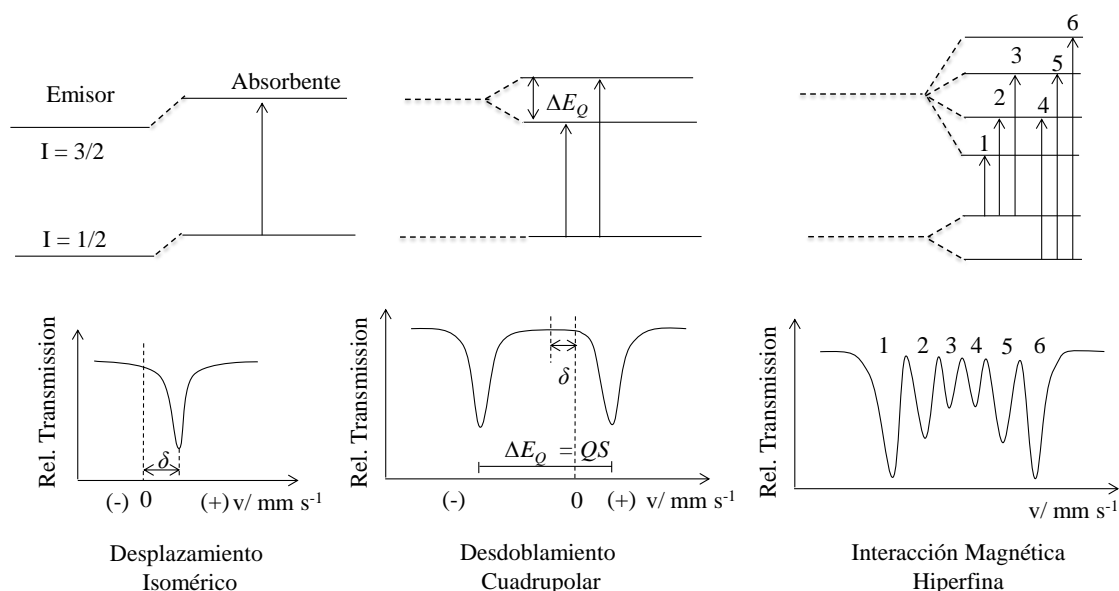


Figura 7. Interacciones hiperfinas del  $^{57}\text{Fe}$  y espectro Mössbauer

Las transiciones entre los subniveles del nivel excitado y los del nivel fundamental están sujetas a las reglas de selección, siendo para el caso de  $^{57}\text{Fe}$ ,  $\Delta m = 0, \pm 1$ . Como resultado se origina un espectro magnético de seis líneas resonantes, cuyas intensidades relativas vienen dadas por la probabilidad de la transición entre los estados inicial y final (Figura 7).

Como se ha descrito, las interacciones hiperfinas resuelven la degeneración cuántica de los niveles nucleares, produciéndose un incremento y/o decremento de su energía originado por el entorno del átomo resonante. Para asegurar la resonancia esta cantidad debe ser adicionada o sustraída a la energía de los fotones emitidos por la fuente radioactiva; en general esto se consigue por movimiento Doppler de la fuente o del absorbente. En nuestro caso, se han registrado los espectros en geometría de transmisión, desplazando la fuente respecto al absorbente, que permanece estático. En el caso del  $^{57}\text{Fe}$  la modulación Doppler supone una variación en la energía de la radiación de 14.4 keV de  $4.80766 \cdot 10^{-8}$  eV por cada mm/s.

El sistema de medida empleado fue un espectrómetro convencional trabajando en modo triangular, con fuente de  $^{57}\text{Co}(\text{Rh})$  de actividad inicial 50 mCi y diámetro activo de 3 mm y 6  $\mu\text{m}$  de espesor. Las medidas se realizaron entre temperatura ambiente y 850 K en un horno MF-2A Ricor

Ltd con un controlador Omrom E5 CS, con estabilidad de  $\pm 0.1$  K, y entre 4.2 K y temperatura ambiente en un criostato Oxford Spectromag, con estabilidad de  $\pm 0.01$  K. Con este último equipo se registraron también espectros entre 4.2 K y temperatura ambiente en presencia de un campo magnético externo de 7 T paralelo a la radiación  $\gamma$ . Los espectros fueron analizados mediante ajuste no lineal con el programa NORMOS [6] y la calibración energética se realizó mediante el espectro de una lámina de  $\alpha$ -Fe (6  $\mu\text{m}$ ). Para llevar a cabo las medidas en el horno, la ferrita de cobalto se mezcló con nitruro de boro (NB) de forma que se aseguró que el absorbente tenía menos de 10 mg de Fe/cm<sup>2</sup>, con lo que se evitaban autoabsorciones y ensanchamiento de las líneas resonantes. El portamuestras empleado también fue de NB. El portamuestras para las medidas a baja temperatura consistía en un bastidor de Cu con ventanas de Be. La muestra, en las medidas a baja temperatura, se montó con grasa de vacío para asegurar un buen contacto térmico al tiempo que se bloqueaba su posible movimiento bajo la acción del campo magnético.

### 3.3.9 Espectroscopia de absorción de rayos X (XANES)

La absorción de Rayos X es una técnica útil para conocer el estado de oxidación de los metales, Fe y Co, constituyentes de la ferrita de cobalto y conocer el entorno cristalográfico de los mismos.

El proceso de absorción de rayos X se debe a la interacción de la radiación con el sólido debido a diferentes fenómenos de dispersión elástica y/o inelástica, pero el proceso físico de absorción más interesante consiste en la emisión por efecto fotoeléctrico de electrones atómicos de los niveles profundos por absorción de un fotón de rayos X. El ion generado es muy inestable, pudiendo estabilizarse por diversos mecanismos, siendo los más probables la emisión de radiación fluorescente si el hueco creado es ocupado por electrones de niveles superiores con la consiguiente emisión de radiación X, o por efecto Auger, cuando esta radiación X es reabsorbida por un electrón secundario que a su vez es emitido generándose un ion doblemente cargado. En un espectro de absorción de rayos X se registra la variación del coeficiente de absorción ( $\mu$ ) con la energía del fotón de rayos X ( $\mu(E)$ ) y se diferencian dos zonas, la región XANES (*X ray Absorption Near Edge Structure*) que corresponde al máximo de absorción, y la región EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*) que es la región del espectro en la que se producen ciertas modulaciones debidas a las interferencias entre las ondas asociadas al fotoelectrón emitido y las ondas retrodispersadas por los átomos vecinos al absorbente, Figura 8. La región EXAFS proporciona por tanto información sobre los átomos vecinos al que absorbe. En este trabajo la interpretación de los resultados se realizará exclusivamente en la región XANES del espectro.



Los espectros se recogieron en modo de transmisión usando dos cámaras de gas ionizante de  $N_2$  y Ar para detectar el haz incidente y el transmitido respectivamente. El tratamiento de datos y la normalización de los espectros de los bordes de absorción, se realizaron empleando el software ATHENA [7].

Las medidas se realizaron en los bordes del Fe y Co en la línea española (SpLine) del European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble (Francia).

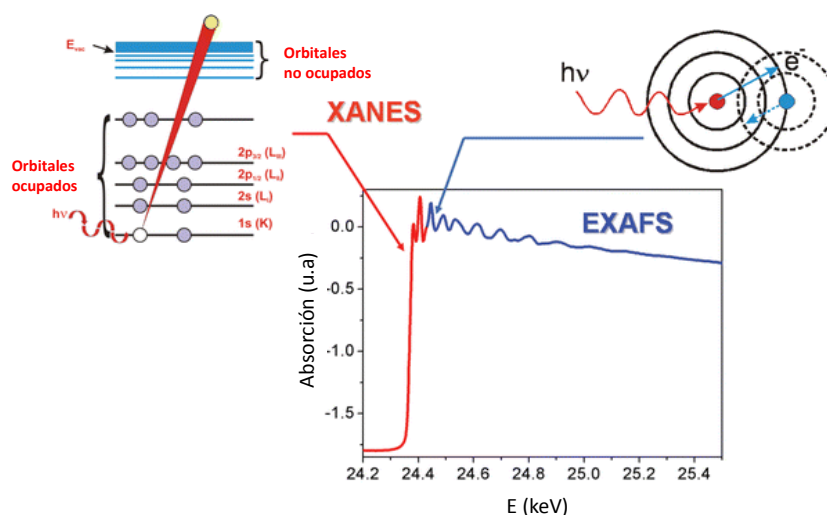


Figura 8. Representación de las dos regiones del espectro de absorción de rayos X.

### 3.3.10 Caracterización coloidal

Para obtener información sobre la naturaleza de la superficie de las partículas, así como de su uniformidad, se determinó el punto isoeléctrico de las muestras, mediante medidas de las movilidades electroforéticas de las dispersiones acuosas de las mismas (Potencial Z) y se determinó su tamaño hidrodinámico (TH). Los fundamentos teóricos en los que se basa esta técnica se describen brevemente a continuación.

#### 3.3.10.1 Tamaño hidrodinámico (TH)

Se ha utilizado un equipo Zetasizer Nano que se encuentra en las instalaciones del Instituto de Ciencia de Materiales (CSIC) para realizar medidas tanto de tamaño hidrodinámico (TH) como de potencial Z de las NPs en suspensión. El equipo está formado por un láser de He-Ne (4 mW, 633 nm), un atenuador laser automático y un detector de fotodiodo.



El equipo de Zetasizer Nano lleva a cabo mediciones del tamaño utilizando un proceso denominado DLS “Dynamic Light Scattering” (también conocido como PCS – “Photon Correlation Spectroscopy”). El DLS cuantifica la velocidad de la fluctuación de la luz teniendo en cuenta que las NPs pequeñas se mueven rápidamente y las partículas grandes se mueven más lentamente. El TH está relacionado, por tanto, con parámetros como la temperatura y la viscosidad del disolvente, y dependerá tanto del tamaño de la NP como de la cubierta que le rodea, así como de la interacción con las moléculas del medio. En general, las NPs grandes dispersan más luz que las pequeñas, debido a que la intensidad de la dispersión de una partícula es proporcional a  $d^6$  (aproximación de Rayleigh), por lo tanto, en muestras con más de un tamaño de NPs los agregados o las NPs grandes contribuirán más a la señal.

En este trabajo las muestras se prepararon suspendiendo las NPs en agua. Se realizaron 3 medidas de cada muestra a 25 °C y los resultados se analizaron en términos de intensidad. Hay que tener en cuenta que para que las medidas sean reproducibles, las NPs tienen que ser estables durante el tiempo de medida.

### 3.3.10.2 Potencial zeta

Al ponerse en contacto la superficie de un óxido con agua, tiene lugar la formación de centros activos, mediante la adsorción de  $H^+$  y  $OH^-$  que son los que fundamentalmente determinan la magnitud del potencial superficial [8, 9]. Estos centros se supone que presentan un comportamiento anfótero, por lo que en disolución acuosa y dependiendo del pH, pueden disociarse. Las fuerzas electrostáticas causadas por la carga superficial, afectan a la distribución de iones en la región interfacial, dando lugar a un aumento de la concentración de iones de carga opuesta (contraiones) en zonas próximas a la superficie de la partícula, así como a la repulsión de iones de la misma carga. De este modo se forma una doble capa eléctrica alrededor de cada partícula, dividiéndose en dos regiones, Figura 9;

- a) Capa más próxima a la superficie o *capa de Stern* formada por contraiones que interaccionan fuertemente con la superficie.
- b) Capa exterior o *capa difusa* en donde los iones interaccionan más débilmente con la superficie y, cuyo límite exterior se denomina plano de deslizamiento.

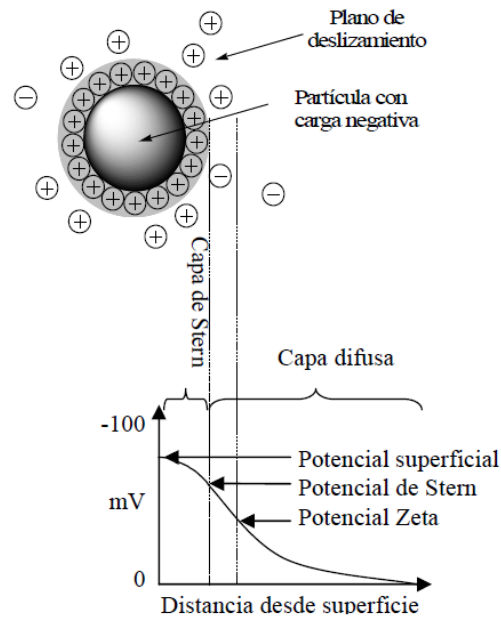


Figura 9. Modelo de la bicapa eléctrica para explicar la distribución de cargas.

El potencial eléctrico generado por la carga superficial y medio en el *límite de deslizamiento* se conoce como el potencial zeta [8]. Se define entonces al potencial zeta como la diferencia de potencial entre un punto de la superficie de la partícula y un punto en la superficie de la bicapa. Considerando que la carga eléctrica sobre una partícula puede afectar drásticamente la interacción entre partículas dispersas y, por tanto, a la estabilidad de la dispersión, el potencial zeta es de gran interés práctico para la caracterización de coloides [8]. De tal forma que si las partículas tienen un potencial zeta muy positivo o negativo, se repelen las unas a las otras, originando una dispersión estable. Sin embargo, si las partículas tienen valores pequeños de potencial zeta, no existe una repulsión lo suficientemente alta como para evitar la agregación, ni la desestabilización de la dispersión. Como límite teórico entre dispersiones estables e inestables se toma el valor de  $\pm 30$  mV [8]. El factor más importante que afecta al potencial zeta es el pH. Si una suspensión presenta un potencial zeta negativo, y se le añade base, las partículas tienden a adquirir mayor carga negativa. Si por el contrario se le añade un ácido, se alcanzara un valor de pH en el que la carga es neutralizada, de modo que si se le añade más ácido, se alcanzara un valor de potencial zeta positivo. Por lo tanto, se define el *punto isoeléctrico (IEP)* como el pH en el cual las cargas positivas y negativas provenientes de todas las fuentes (carga superficial y carga en capas de Stern y difusa) sean iguales, siendo este valor en el que el sistema coloidal tiene menor estabilidad.

El potencial Zeta se determina mediante movilidad electroforética. La medida del potencial Z se realiza aplicando un campo eléctrico al coloide. Las NPs migrarán al polo de carga contraria con una velocidad proporcional a la magnitud del potencial Z. Esta velocidad de migración depende de la

constante dieléctrica del medio y la viscosidad del mismo. Una vez conocida la movilidad electroforética de las NPs, podemos obtener el potencial  $Z$  aplicando la ecuación de Henry (ecuación 3.9): siendo  $Z$  el potencial,  $U_E$  la movilidad electroforética,  $\varepsilon$  la constante dieléctrica del medio,  $\eta$  la viscosidad y  $f(K_a)$  la función de Henry, que suele tomar los valores de 1.5 o 1 dependiendo de la aproximación teórica que se elija (Smoluchowski o el de Hückel). La elección de una u otra aproximación depende fundamentalmente del disolvente donde se encuentren las NPs (acuoso u orgánico) y el tamaño de las mismas.

$$U_E = \frac{2\varepsilon Z f(k_a)}{3\eta} \quad (3.9)$$

Para la medida del potencial  $Z$  se prepararon disoluciones de NPs a una concentración aproximada de 0,01 mg/mL en  $\text{KNO}_3$  (electrolito inerte) a diferentes pHs. Las medidas se analizaron tras realizar 3 repeticiones de cada una.

## 3.4 Aplicaciones Biomédicas

### 3.4.1 Hipertermia

Como ya se ha mencionado anteriormente, la hipertermia es un tipo de tratamiento en el que se expone el tejido corporal a temperaturas altas para dañar o destruir células cancerosas, mediante la utilización de materiales magnéticos, los cuales calientan el tejido al exponerlos a un campo magnético. Las medidas del calor disipado por los coloides sintetizados en esta tesis, se han realizado utilizando dos equipos diferentes. El primero de ellos, situado en el “*Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-objets*” (LPCNO) de Toulouse es un equipo “*hand made*”, en él se realizaron medidas de temperatura vs tiempo a diferentes valores de campo magnético aplicado y medidas de ciclos de histéresis (M vs H) con frecuencia variable. El segundo equipo utilizado es el equipo comercial Magnetherm 1.5 (Nanotherics), situado en el Instituto de Magnetismo Aplicado (IMA) de Madrid, donde se pueden realizar medidas de temperatura vs tiempo aplicando diferentes campos magnéticos y frecuencias. A continuación se describe brevemente cada uno de ellos.

### 3.4.1.1 Equipo de hipertermia - Toulouse

#### Medidas temperatura vs tiempo

El equipo de hipertermia utilizado, durante una estancia predoctoral de tres meses, fue diseñado en el (LPCNO) perteneciente al CNRS en Toulouse (Francia), por el Dr Julian Carrey. El equipo consta de un electroimán alimentado a través de un amplificador de potencia de banda ancha [10]. La optimización de este electroimán y el uso de un transformador de corriente permiten generar campos magnéticos alternos ( $\mu_0 H_{AC}$ ) entre 5 hasta 51 mT para frecuencias de 30 a 100 kHz. La medida de la temperatura en tiempo real se consigue mediante sensores ópticos de temperatura "Neoptics, Reflex 4" (resolución 0,01 ° C en el rango de 25 a 200 ° C) insensible al entorno electromagnético. Para limitar las interferencias debidas a variaciones térmicas del entorno, se utilizaron, dos portamuestras colocados en el interior del electroimán, uno contendrá el coloide y el otro el mismo volumen de agua. En el interior del portamuestras con el coloide se encuentran dos sensores de temperatura, uno de ellos inmerso en el coloide a una profundidad de 5 mm ( $T_{c1}$ ) y el otro a 9 mm ( $T_{c2}$ ), de modo que así se pueden tomar simultáneamente dos temperaturas, en el portamuestras con agua se encuentra un único sensor en el centro de la muestra  $T_{agua1}$ , de modo que el valor final de la medida de temperatura es  $T_f = \frac{(T_{c1} + T_{c2})}{2} - T_{agua1}$ . Así se sustrae el calor generado por el electroimán sobre el agua del valor de incremento de temperatura del coloide, refiriendo solo ese incremento a la potencia calorífica de las NPs bajo la acción del campo magnético alterno.

#### Medidas de ciclos de histéresis en AC

La magnetización del coloide fue medida en un campo magnético alterno ( $\mu_0 H_{AC}$ ) generado por una bobina de alambre Litz refrigerada con aire. Dentro de esta bobina, se encuentra un sistema comprendido por un calorímetro y dos bobinas compensadas conectadas en serie. Las dos bobinas de captación tienen el mismo área ( $S_{coil}$ ) y numero de espiras,  $n$ . Todo el conjunto se coloca en el centro de un electroimán que produce perpendicularmente el campo magnético estático,  $\mu_0 H_{DC}$ . La amplitud del campo magnético alterno se obtiene utilizando, la ecuación 3.10.

$$\mu_0 H_{AC} = \frac{\int e_1 dt}{n S_{coil}} \quad (3.10)$$

dónde  $e_1$  es el voltaje entre los terminales de la bobina vacía. La magnetización por unidad de masa de las nanopartículas se obtiene utilizando la ecuación 3.11.

$$M = \frac{\int e_2 dt}{\mu_0 n \rho S_{vessel} C} \quad (3.11)$$

dónde  $S_{vessel}$  es el área de la sección del calorímetro que contiene la solución coloidal,  $C$  es la concentración en volumen de la muestra,  $\rho$  es la densidad de las NPs, y  $e_2$  es el voltaje de las dos bobinas en serie [11]. Los ciclos de histéresis fueron medidos a una frecuencia de 52 kHz para valores de  $\mu_0 H_{AC}$  entre 0 y 85 mT.

### 3.4.1.2 Equipo de hipertermia – Nanotherics

Se realizaron también medidas de hipertermia en el equipo comercial Magnetherm 1.5 (Nanotherics), con frecuencias de trabajo de 110 kHz, y amplitudes de campo magnético de hasta 20 mT. Un mililitro de la muestra se sitúa en el centro del solenoide donde el campo magnético es máximo. La temperatura del solenoide se controla con un circuito cerrado de agua recirculante a 20 °C. La temperatura del coloide se mide con un termómetro de fibra óptica. Antes de la activación del campo magnético se mide la temperatura durante 30 segundos, cuando el campo se aplica, se realiza la medida durante 300 segundos.

Además de los coloides en agua se han medido las muestras en agar-agar. Estas se prepararon con un ml de coloide en agua sonicando mientras se eleva la temperatura a 45 °C, al que se añadió 10% en peso de agar, se sonicó un minuto, posteriormente se enfrió el recipiente con agua durante 1 minuto y se reservó en la nevera hasta su uso.

### 3.4.2 Relaxometría por resonancia magnética nuclear

Esta técnica ha sido utilizada para medir los tiempos de relajación  $T_1$  y  $T_2$  de los protones del agua de las disoluciones acuosas de los ferrofluidos. Estos valores sirven para cuantificar la relajatividad, que permite caracterizar unas NPs como posibles agentes de contraste.

Las medidas fueron adquiridas en un Minispec Bruker mq60, situado en el INA de Zaragoza, operando a un campo magnético de 1.4 T, una frecuencia de 60 MHz y a 37 °C de temperatura. Las muestras de diferentes concentraciones se prepararon en agua destilada y fueron estabilizadas a 37 °C antes de cada medida.

Para el cálculo de las relajatividades  $r_1$  y  $r_2$  se representaron los valores inversos de  $T_1$  y  $T_2$  respectivamente (en segundos) frente a las diferentes concentraciones de Fe y Co de las nanopartículas (en mM). La relajatividad es la pendiente del ajuste lineal obtenido al representar los inversos de los tiempos de relajación en función de la concentración de Fe y Co de las NPs.

### 3.4.3 Imagen por resonancia magnética *in vitro*

Los ensayos *in vitro* se realizaron tras la siembra de células HeLa y A-549 con una concentración determinada de NPs con un periodo de incubación de 24 h. Tras este periodo las células se resuspendieron en PBS (del inglés *phosphate buffered saline*) para realizar el ensayo de imagen (más detalle en, sección 3.5.5, página 88).

Las medidas mediante resonancia magnética nuclear se realizaron en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), de Madrid, en un equipo Agilent/Varian scanner equipado con una consola DD2 y con bobina de inserción 205/120 con una gradiente de fuerza de campo magnético de 130 mT/m y una combinación de bobina de excitación de volumen en cuadratura de 7.2 mm y bobina de recepción de dos canales. La reconstrucción de los datos obtenidos se llevó a cabo empleando el software Osirix [12].

## 3.5 Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos se realizaron en el instituto de Nanociencia de Aragón (INA) durante una estancia breve predoctoral, y en el Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid.

Los ensayos biológicos realizados se centraron en el estudio de la citotoxicidad de las NPs sobre tres tipos diferentes de líneas celulares, incluyendo en ellos, el estudio de las proteínas que componen el citoplasma celular. También se han realizado estudios de internalización celular y ensayos con inhibidores de endocitosis sobre células HeLa. Por último se han preparado cultivos celulares con diferentes concentraciones de NPs para realizar ensayos de contraste de imagen, como se explicó en la sección 3.4.3, página 85.

### 3.5.1 Líneas celulares utilizadas

Las líneas celulares utilizadas fueron; HeLa (derivadas de carcinoma cervical humano), A549 (derivadas de carcinoma de pulmón humano) y Vero (células epiteliales de riñón de mono). Las células fueron mantenidas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)(Lonza), suplementados con 2 mM de L-glutamina (Invitrogen), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y un 10 % de suero fetal bovino (SFB)(PAA Laboratories). Todas las células fueron propagadas a 37°C bajo una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Todos los experimentos fueron llevados a cabo con células al 60-70% de confluencia celular.

Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo utilizando coloides de NPs recubiertos con AC y con AF. Antes de cada ensayo los coloides fueron sonicados y filtrados en condiciones de esterilidad con filtros Millipore de 0.2 µm. Tras cada ensayo el coloide se mantiene en condiciones de esterilidad y a 4 °C, para ensayos futuros. Antes de volver a utilizar el coloide se procedía a una nueva etapa de sonicación. Las concentraciones utilizadas de NPs para cada ensayo fueron calculadas y preparadas a partir del coloide de partida y enrasadas con DMEM.

### 3.5.2 Estudios de citotoxicidad: MTT

La viabilidad celular fue determinada utilizando Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT), una sal de tetrazolio que es transformada por las deshidrogenasas mitocondriales de células vivas en cristalitas de formazan, insolubles en agua pero solubles en dimetilsulfóxido (DMSO). La cantidad de formazan generada es proporcional al número de células vivas presentes en el medio. Se sembraron 7500 células (HeLa) en una placa estándar de 96 pocillos. Tras 24 horas de incubación, se añadieron las NPs recubiertas con AC y AF a una concentración final de 0, 100, 250 y 500 µg/mL en 200 µL de medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Tras 24 horas de incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> se retiró el medio tras centrifugar las células a 700 rpm durante 10 minutos. Se añadieron 200 µL de medio de cultivo con 20 µL de MTT 5mg/mL en PBS. Tras cuatro horas de incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, se centrifugaron de nuevo las células y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 200 µL de DMSO y se mezclaron cuidadosamente con las células para disolver los cristales de formazán, adquiriendo la disolución un tono azul, su intensidad dependerá de la cantidad de células vivas existentes en cada pocillo.

La absorbancia de esta disolución fue medida en su máximo (570 nm) en un lector de placas (ELx800TM, Biotek). Considerando que las NPs pueden interferir en los resultados, la disolución de DMSO fue retirada de cada uno de los pocillos y la absorbancia de la placa fue de nuevo cuantificada.

El valor real de absorbancia se obtuvo sustrayendo la absorbancia exclusiva de las NPs de la absorbancia obtenida con NPs + formazan disuelto en DMSO. Los experimentos fueron realizados por quintuplicado y se repitieron dos veces.

Los resultados de viabilidad se compararon con los de las células sin NPs según la ecuación 3.12.

$$\%V = \frac{Abs(NP_s + células + medio) - Abs(NP_s)}{Abs(células + medio)} * 100 \quad (3.12)$$

### 3.5.3 Tinción con azul de toluidina

Para visualizar la internalización celular de las NPs, las células HeLa y A549 se sembraron en cubreobjetos e incubaron para una concentración de NPs de (0.05 mg/ml), se lavaron con PBS (x5), se fijaron en metanol frío (5 min), se tiñeron con azul de toluidina (TB Merck, Darmstadt Germany) en concentración 0.05 mg/ml en agua destilada, durante 30 segundos, se lavó posteriormente con agua destilada y fueron secadas al aire. Los cubres fueron montados con DePeX (Serva, Heidelberg Germany) y observados en el microscopio de campo claro.

### 3.5.4 Inmunofluorescencia indirecta - Tinción del citoesqueleto

Tras el estudio de la citotoxicidad celular mediante el método MTT, también se realizaron tinciones de los filamentos del citoesqueleto celular para comprobar su morfología.

#### 3.5.4.1 Filamentos de actina

La organización de los microfilamentos de actina se evaluó mediante tinciones con faloidina conjugada con rodamina.

Las células crecidas sobre los cubreobjetos se fijan 15 min con formaldehído diluido 1:10 en PBS, se lavaron con PBS tres veces y se permeabilizaron 5 min con Tritón X-100 (0,5% v/v). Se añaden 50 µl de TRITC-faloidina a concentración 1:200 en PBS, durante 45 min a 37 °C. Se lavan con PBS (x3), se contratiñen los núcleos con Hoechst 33258 (fluorocromo que interacciona específicamente con el ADN) en concentración de 5 µg/ml, durante 3 min, se lavan con agua



destilada, se montan con Prolong (Molecular Probes, USA) y se observaron en microscopía de fluorescencia con excitación verde y UV.

#### **3.5.4.2 Filamentos de tubulina**

Los microtúbulos se pueden observar mediante inmunofluorescencia indirecta para tubulina. Las células sembradas en los cubreobjetos se fijan 5 min con metanol frío, se lavan con agua destilada (x3) y con PBS (x3), se permeabilizaron con Tritón X-100 (0,5% v/v) 5 min y se incubaron 1 h a 37 °C con 50 µl de anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de ratón anti-tubulina, Sigma-Aldrich), diluido en PBS a una concentración 1:100. Se lavaron con PBS (x3), se permeabilizaron con Tritón 5 min más y se incubaron 1 h y 15 min a 37 °C con 50 µl del anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con FITC, Sigma-Aldrich) a una concentración 1:200 en PBS. Se lavan con PBS tres veces y se contratiñen los núcleos con Hoechst-33258 (5 µg/ml) durante 3 min. Se lavaron con agua destilada y se montaron con Prolong. Las observaciones se realizaron en microscopía de fluorescencia bajo luz de excitación azul.

#### **3.5.5 Internalización de NPs en células - Ensayos MRI *in vitro*.**

Los ensayos de MRI se realizaron con las líneas celulares HeLa y A549 y cuatro concentraciones diferentes de NPs (0, 0.025, 0.05, 0.25 mg/ml NPs).

En un F25 se siembran células HeLa o A549 para un volumen de 3,5 ml en DMEM, se dejan crecer hasta el 70% de confluencia celular. Pasado este tiempo, se retira el medio y se añade una disolución de DMEM de 3.5 ml con concentración conocida de NPs (0, 0.025, 0.05, 0.25 mg/ml). Se dejan las células con las NPs 6h o 24h, y pasado este tiempo se retira el medio, se lava con PBS(x3), se tripsiniza con 1ml, seguidamente se para la tripsinización con 5ml de DMEM, se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 30µl de etanol frío al 70%. Se congela la muestra. Posteriormente, antes del ensayo de MRI se descongela cada una de las muestras y se resuspende en 2ml de PBS, se pasa a un eppendorf donde debe quedar la menor cantidad de aire posible. Este procedimiento se lleva a cabo por duplicado para células HeLa en concentraciones (0, 0.025, 0.05 y 0.25 mg/ml) para 6 y 24 h y para células A549 también por duplicado para concentraciones (0 y 0.05 mg/ml) para 6 y 24 h de internalización celular.

### 3.5.6 Microscopio óptico

Las fotografías morfológicas fueron tomadas con los microscopios Olympus BX61, equipados con una cámara digital Olympus DP50 digital camera y con el microscopio Leica TCS SPE. Las imágenes fueron tratadas con el programa Image J y Photoshop.

## Referencias

- [1] Cabrera, L.;Gutierrez, S.;Menendez, N.;Morales, M. P.; Herrasti, P. Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochimica Acta*. **2008**, *53*, 3436-3441.
- [2] Campelj, S.;Makovec, D.; Drofenik, M. Preparation and properties of water-based magnetic fluids. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal*. **2008**, *20*, 204101.
- [3] Rietveld, H. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. *Journal of Applied Crystallography*. **1969**, *2*, 65-71.
- [4] Roisnel, T.; Rodriguez-Carvajal, J. WinPLOTR: A Windows tool for powder diffraction patterns analysis. In *Materials Science Forum, Proceedings of the Seventh European Powder Diffraction Conference (EPDIC 7)*; Barcelona (Spain), 2000; pp 118-123.
- [5] Standard Reference Material 640b. In *Departament of Commerce*; National Bureau of Standards, MD 20899; Gaithersburg, 1987.
- [6] Brand, R. A. Improving the validity of hyperfine field distributions from magnetic alloys: Part I: Unpolarized source. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. **1987**, *28*, 398-416.
- [7] Ravel, á.; Newville, M. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of synchrotron radiation*. **2005**, *12*, 537-541.
- [8] Zetasizer nano series user manual. In *MAN0317*, 2004; pp 270.
- [9] Shaw, D. J. *Introducción a la química de superficies y coloides*: Madrid, España,, 1990.
- [10] Lacroix, L. M.;Carrey, J.; Respaud, M. A frequency-adjustable electromagnet for hyperthermia measurements on magnetic nanoparticles. *The Review of scientific instruments*. **2008**, *79*, 093909.
- [11] Mehdaoui, B.;Carrey, J.;Stadler, M.;Cornejo, A.;Nayral, C.;Delpech, F.;Chaudret, B.; Respaud, M. Influence of a transverse static magnetic field on the magnetic hyperthermia properties and high-frequency hysteresis loops of ferromagnetic FeCo nanoparticles. *Applied Physics Letters*. **2012**, *100*, 052403-052403-052403.
- [12] Rosset, A.;Spadola, L.; Ratib, O. OsiriX: An open-source software for navigating in multidimensional DICOM images. *J Digit Imaging*. **2004**, *17*, 205-216.

# Capítulo 4

## RESULTADOS Y DISCUSION



# Índice

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	95
4.1	Electrosíntesis de Ferrita de Cobalto .....	95
4.1.1	Efecto de área y disposición de los electrodos .....	96
	Conclusiones.....	98
4.1.2	Efecto de la temperatura .....	98
	Conclusiones.....	107
4.1.3	Efecto de la intensidad de corriente aplicada .....	107
4.1.3.1	Síntesis a 60 °C .....	107
	Conclusiones.....	112
4.1.3.2	Síntesis a 25 °C .....	112
	Conclusiones.....	116
4.1.4	Efecto de la agitación magnética .....	116
	Conclusiones.....	118
4.2	Relación del Tamaño de las NPs y su Respuesta Magnética .....	119
4.2.1	Dependencia de $H_c$ con el tamaño de partícula.....	119
4.2.2	Dependencia de $M_s$ con el tamaño de partícula.....	121
4.2.3	Dependencia de la relación $M_r/M_s$ con el tamaño de partícula.....	122
4.3	Propiedades Coloidales de la Ferrita de Cobalto tras la Síntesis Electroquímica.....	124
4.4	Intercambio de Surfactante: Estabilización con AC.....	126
4.5	Estructura Magnética y Cristalográfica de las NPs de $CoFe_2O_4$ .....	129
4.5.1	Absorción de rayos X (XANES) .....	131
4.5.2	Espectroscopia Mössbauer .....	135
4.5.3	Caracterización magnética – SQUID.....	142
4.5.4	Difracción de neutrones .....	145
4.6	Funcionalización de las NPs con Ácido Fólico .....	152
4.7	Toxicidad de la Ferrita de Cobalto.....	157
4.7.1	Estudio de viabilidad celular (toxicidad).....	159
4.7.1.1	MTT con diferentes tamaños hidrodinámicos .....	159
4.7.1.2	MTT con diferentes líneas celulares.....	160
4.7.1.3	MTT con diferentes recubrimientos.....	162
4.7.1.4	MTT de los ensayos <i>in vitro</i> de Resonancia magnética de imagen .....	164
4.7.2	Estudio de la morfología y el citoesqueleto celular en $CoFe$ -25°C-AF.....	166
4.8	Resonancia Magnética de Imagen.....	169

4.9 Hipertermia Magnética..... 175

Referencias..... 186

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 4.1 Electrosíntesis de Ferrita de Cobalto

Como se mencionó con anterioridad, debido a la estequiometría de la ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ), y dado que uno de los objetivos finales de esta tesis doctoral es la síntesis estequiométrica de este compuesto mediante técnicas electroquímicas, inicialmente se partió de la suposición de que para liberar iones de Fe y Co a la disolución en proporción 2:1 se debería utilizar la misma relación en las intensidades aplicadas a los electrodos, este valor por tanto se estableció en 100 mA aplicados sobre la lámina de Fe y 50 mA sobre la de cobalto.

Además existen otros parámetros que afectan a la formación de nanopartículas de ferrita de cobalto, por lo que para poder evaluarlos se estudió de forma independiente cada uno de ellos fijando el resto. El proceso de lavado del producto obtenido fue idéntico en cada ensayo, para así minimizar posibles variaciones que podrían llevar a una conclusión errónea sobre los resultados del método de síntesis (Capítulo 3, sección 3.1, página 63).

A continuación se exponen los efectos que tienen en la estequiometría y morfología de las partículas el área de los electrodos, la forma y la disposición del cátodo, manteniendo fija la agitación de la disolución (1100 rpm), la intensidad de corriente de oxidación del hierro (100 mA), la intensidad de corriente de oxidación del cobalto (50 mA), el tiempo de síntesis (30 minutos) y la temperatura de trabajo (25 °C).



#### 4.1.1 Efecto de área y disposición de los electrodos

La síntesis de ferritas de cobalto se basó, como ya se ha indicado, en el estudio previo de la electrosíntesis de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) [1]. En este trabajo se observó que la síntesis de este tipo de materiales está muy influenciada por la separación entre el ánodo y el cátodo dentro de la celda. Para estudiar el efecto de este parámetro, se realizaron ensayos con los tres tipos de disposición de los electrodos, mencionados en el capítulo 3, (sección 3.1.1, página 66).

La distribución de campo eléctrico en el dispositivo 1 es menos efectiva que en el dispositivo 2 y 3, ya que las líneas de campo en estos últimos casos son uniformes en el ánodo. Como consecuencia de este efecto de campo, el compuesto obtenido con el dispositivo 1 presenta una baja cristalinidad y un tamaño de partícula menor, como muestra su difractograma, Figura 1, donde se aprecian además de las reflexiones que corresponden a la estructura espinela de la ferrita de cobalto con la ficha JCPDS-01-086-1352 y grupo espacial ( $Fd\bar{3}m$ : 227) otra reflexión a ángulo  $2\theta$  40.16°, relativamente intensa atribuible a  $\text{FeOOH}$  con la ficha JCPDS-01-077-0247 y grupo espacial ( $P\bar{3}m1$ : 164) que impurifica la muestra. Por el contrario, cuando el cátodo se encuentra dispuesto alrededor de los ánodos (dispositivo 2 y 3) es evidente en el difractograma de rayos X la reducción en la intensidad de la reflexión atribuida a  $\text{FeOOH}$  y el aumento de la cristalinidad de la muestra. La comparación de los difractogramas de los materiales obtenidos mediante el uso de los dispositivos 2 y 3, por el contrario no muestra claras diferencias. Indicando que las líneas de campo eléctrico son homogéneas en los dos dispositivos.

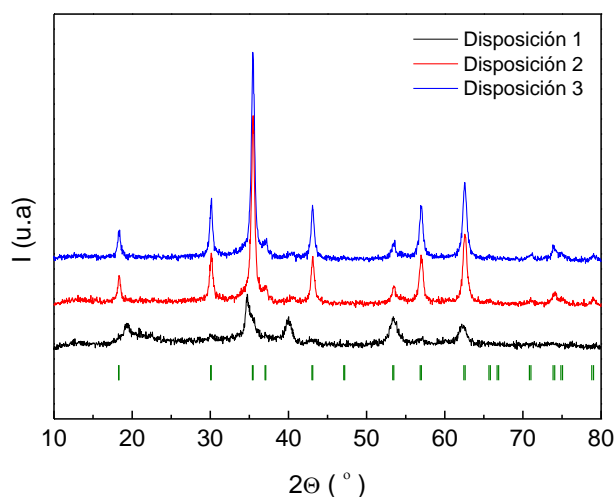


Figura 1. Difractograma de rayos X de las nanopartículas obtenidas mediante las tres disposiciones geométricas de electrodos en la celda electroquímica. (I) Posiciones de Bragg de la estructura  $Fd\bar{3}m$ .

La separación entre los ánodos de 0.9 o 0.5 cm, empleada en el dispositivo 2 y 3 respectivamente, muestra que no existe ningún efecto sobre la estructura del material obtenido, Figura 1. En el proceso de síntesis una de las etapas determinantes para obtener el compuesto es la formación de oxihidróxidos de Fe y Co previa a la electroreducción de estos en el cátodo, una disminución de la distancia de ánodos favorece o al menos no perjudica la formación de los oxihidróxidos y la llegada de estos al cátodo para su posterior reducción. Se ha comprobado, sin embargo, que distancias entre los ánodos mayores a 2 cm dan lugar a mezclas de productos con predominancia de hidróxidos u oxihidróxidos. Nuevamente, la razón de esta diferencia está en el mecanismo de síntesis y las reacciones que tienen lugar en los ánodos y el cátodo, (capítulo 3, sección 3.1, página 63). Una separación grande de los ánodos conlleva a la formación de estos productos intermedios que no alcanzan el cátodo de forma continuada provocando la formación de mezclas de compuestos, entre ellos magnetita e hidróxidos que precipitan conjuntamente a la ferrita de cobalto formada.

En resumen, y debido a las etapas de síntesis que tienen lugar, los iones hidroxilo generados en el cátodo, tienen que alcanzar de forma rápida la interfase ánodo/disolución para proporcionar el medio básico que produzca la formación de los oxihidróxidos de hierro y cobalto y estos tienen que alcanzar de forma simultánea al cátodo para producir la ferrita de cobalto. Si la separación entre los ánodos y el cátodo es suficientemente grande, la reducción de los oxihidróxidos formados se ve limitada por la migración al cátodo, no produciéndose la reducción de los mismos y generando ferrita de cobalto con gran cantidad de impurezas. Por otro lado un aumento del área del cátodo como sucede en los dispositivos 2 y 3 permite una mayor área activa para la reducción de los intermedios de reacción formados.

Las muestras obtenidas mediante los tres dispositivos fueron analizadas mediante TXRF, y las relaciones molares Fe/Co de las muestras electrosintetizadas fueron 2.92, 2.80 y 2.90 respectivamente. La proporción de los iones liberados en el medio durante la oxidación es prácticamente constante independientemente del dispositivo utilizado, la principal diferencia por tanto es cómo esos iones reaccionan entre sí para formar la ferrita de cobalto, que sí será dependiente de la forma y geometría de ánodos y cátodo.

Tras los resultados mostrados, se podría haber optado por el uso del dispositivo 2 o el 3 indistintamente, aunque finalmente se optó por fijar como geometría de trabajo la del dispositivo 2, con distancia entre ánodos de 0.9 cm y disposición del cátodo cilíndrica con un área de 120 cm<sup>2</sup> debido a que el control de la separación de los ánodos a 0.5 cm se hacía más complicado y los resultados en cuanto a la estructura y composición de la ferrita de cobalto que se obtenía no eran diferentes.

El contenido Fe/Co determinado en estas primeras síntesis fue muy superior al valor estequiométrico que correspondería a 2.0. Los valores altos de Fe, son debidos en el primer dispositivo a la presencia de exceso de hidróxidos de hierro no reducidos que están presentes en la muestra como impurezas. Por el contrario en los dispositivos 2 y 3 se han obtenido unas muestras cuyos difractogramas no presentan a priori fases contaminantes, pero la alta presencia de Fe en las muestras indica la posible formación simultánea de magnetita, cuyo difractograma presenta reflexiones en posiciones  $2\theta$  muy semejantes a las de la ferrita de cobalto (una detallada explicación se abordará en la sección 4.1.2, página 98).

## Conclusiones

Se puede concluir que aunque los dispositivos 2 y 3 mejoran la efectividad del sistema en cuanto a la formación de un producto más cristalino y con menor presencia de impurezas debidas a hidróxidos, las condiciones de trabajo utilizadas no han sido las óptimas para obtener ferrita de cobalto estequiométrica. Es por ello que se procedió a realizar un estudio del efecto que tenían otros parámetros como la temperatura de síntesis sobre las propiedades del material.

### 4.1.2 Efecto de la temperatura

Para valorar el efecto de la temperatura sobre el material sintetizado, se trabajó a tres temperaturas diferentes, 25, 60 y 80 °C, aplicando en cada una de ellas 100 mA a la lámina de Fe y 50 mA a la lámina de cobalto y manteniendo constante la agitación (1100 rpm) y la disposición 2 de electrodos, (capítulo 3, sección 3.1.2, página 66). El difractograma de rayos X del polvo obtenido a 25 °C (muestra CoFe(50:100)mA-25 °C, comentada en la sección previa, dispositivo 2), muestra posiciones  $2\theta$  asignables a la estructura cubica de la espinela ( $Fd\bar{3}m$ : 227), Figura 2. Todos los picos pueden ser indexados a dicha estructura, como corroboran las posiciones de Bragg en la parte inferior del difractograma, excepto un pico débil que se resalta con círculo rojo y se muestra más explícitamente en el recuadro de la Figura 2. Este pico aparece en posición  $2\theta$  40.16° y es atribuible a la ferrihidrita (FeOOH), con sistema cristalino hexagonal y grupo espacial ( $P\bar{3}m1$ : 164).

Mediante difracción de rayos X se corrobora por tanto, que se ha sintetizado un compuesto con estructura espinela y una pequeña impureza de ferrihidrita, pero no se puede corroborar que el compuesto formado sea exclusivamente ferrita de cobalto, ya que la magnetita presenta la misma estructura cúbica con posiciones de difracción muy similares, además también cabe la posibilidad de

que se hayan sintetizado ambas simultáneamente, lo que parece indicar los análisis de TXRF mencionados anteriormente (página 96).

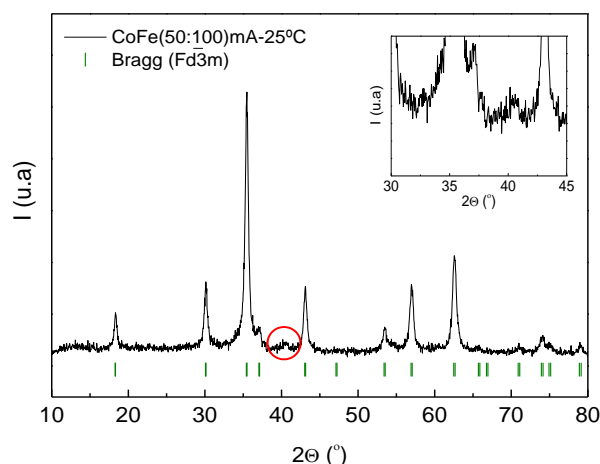


Figura 2. Difractograma de rayos X de la muestra CoFe(50:100)mA-25 °C. En el recuadro interior se muestra amplificado el pico de difracción que no se corresponde con la estructura espinela. (I) Posiciones de Bragg de la estructura  $Fd\bar{3}m$ .

La relación molar  $[\text{Fe}]/[\text{Co}] = 2.8$ , se encuentra alejada del valor de 2.0 esperado en una ferrita de cobalto estequiométrica. De hecho este exceso de hierro está relacionado con la presencia de la impureza de ferrihidrita y/o magnetita. Del análisis semicuantitativo de las fases en el difractograma de rayos X [2] se obtiene una proporción de 73% de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ( $Fd\bar{3}m$ : 227), 18% de  $\text{FeOOH}$  ( $P\bar{3}m1$ : 164) y 9% de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (ficha JCPDS-01-077-0426 y grupo espacial  $Fd\bar{3}m$ : 227), proporción que concuerda con el exceso de Fe determinado mediante TXRF.

Dada la similitud estructural entre las espinelas  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , y puesto que el óxido de hierro más estable es la hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) con estructura hexagonal, se calentó la muestra en un horno a 600 °C durante 16 h en presencia de  $\text{O}_2$  para que los óxidos del tipo  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  o  $\text{FeOOH}$  que pudiesen estar presentes en la muestra evolucionaran para formar  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , mientras que la ferrita de cobalto se mantiene estable al menos hasta 800 °C – 900 °C [3]. La muestra tratada se analizó mediante difracción de rayos X, obteniéndose el difractograma de la Figura 3. En esta figura, se puede apreciar como aparecen reflexiones a  $2\theta$  24.3, 33.2, 41, y 50 grados, marcadas con círculos azules, que no se encontraban con anterioridad al tratamiento térmico. Estas nuevas reflexiones coinciden con las posiciones  $2\theta$  de la estructura romboédrica de hematita (posiciones de Bragg color rosa), formada a partir de la evolución de la magnetita y de la ferrihidrita con el calentamiento. El análisis cuantitativo de la muestra a partir de este nuevo difractograma muestra una proporción 71.4% de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  y 28.6% de  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (ficha JCPDS-01-073-2234 con estructura romboédrica y

grupo espacial  $R\bar{3}c$ : 167), concordando con la composición determinada con anterioridad al tratamiento térmico y con la proporción Fe/Co obtenida mediante TXRF [2].

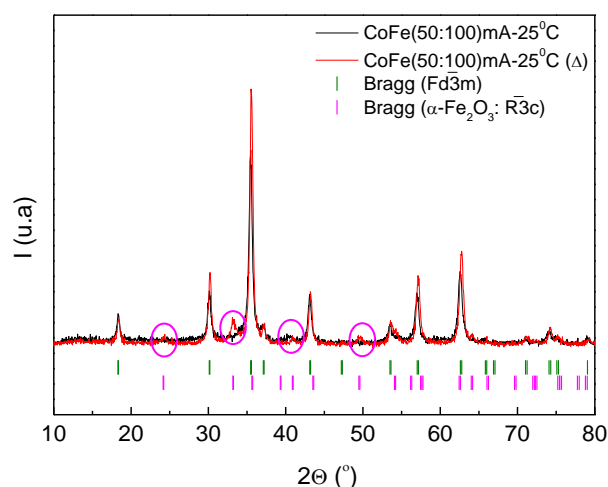


Figura 3. Difractograma de rayos X de la muestra CoFe(50:100)mA-25 °C (negro) y misma muestra calentada a 600 °C durante 16 h (rojo). Posiciones de Bragg de (I) estructura  $Fd\bar{3}m$  y (I) estructura  $R\bar{3}c$ .

Como la síntesis a 25 °C e intensidades aplicadas de 50:100 mA – Co:Fe resultó en la formación de mezcla de ferrita de cobalto, magnetita y ferrihidrita, se procedió a realizar la síntesis en las mismas condiciones de intensidad, agitación, área de electrodos, etc... pero modificando la temperatura a 60 °C. El difractograma del material obtenido a esta temperatura se muestra en la Figura 4.

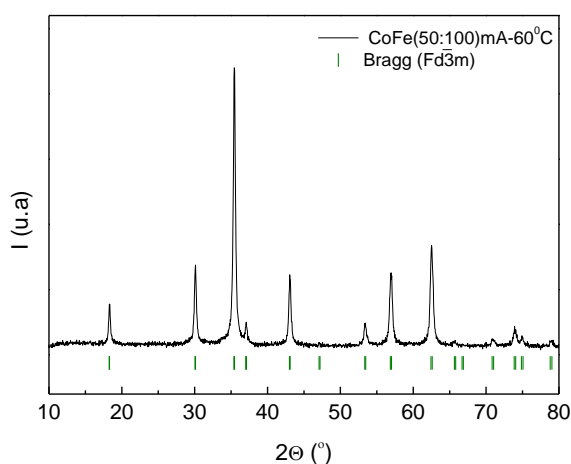


Figura 4. Difractograma de rayos X de la muestra CoFe(50:100)mA-60°C. (I) Posiciones de Bragg de la estructura  $Fd\bar{3}m$ .

La indexación del difractograma muestra solo la presencia de picos correspondientes a una estructura cúbica de tipo espinela. Por otro lado la proporción molar de  $[\text{Fe}]/[\text{Co}]$  analizada por TXRF es de 2.5. Comparando estos datos con los mostrados para la síntesis a 25 °C, se puede concluir que la temperatura afecta a la electrooxidación de las láminas, ya que a mayor temperatura más cantidad de cobalto se incorpora a la estructura, pasando de 2.8 a 2.5 en relación molar  $[\text{Fe}]/[\text{Co}]$ . El exceso de hierro que aún se determina, respecto a la relación estequiométrica deseada, se atribuye a la presencia de magnetita como contaminante en el material formado. Este hecho queda confirmado al tratar la muestra térmicamente a 600 °C, durante 16 h en presencia de  $\text{O}_2$ . Del ajuste del difractograma de la muestra tratada, mediante el método de Rietveld con el programa Fullprof [4], se determina la presencia de las fases  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  y  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , Figura 5.

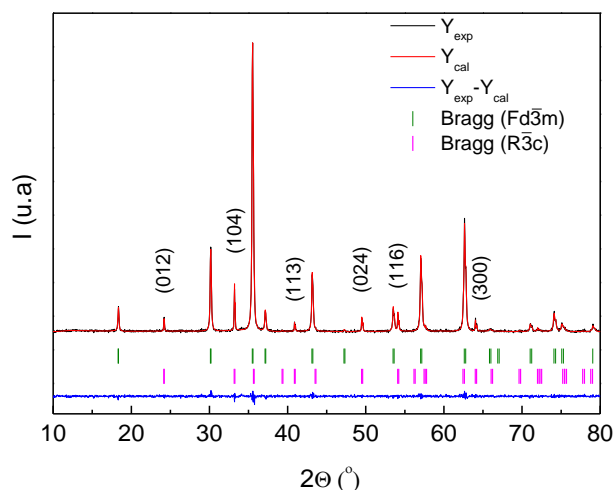


Figura 5. Refinamiento Rietveld del difractograma de rayos X de la muestra  $\text{CoFe}(50:100)\text{mA}-60^\circ\text{C}$  calentada a 600 °C (16 h), (Fase  $Fd\bar{3}m$ ):  $R_{\text{Bragg}} = 2.03$ ,  $R_f = 1.49$ , Fase  $R\bar{3}c$ :  $R_{\text{Bragg}} = 4.70$ ,  $R_f = 5.01$ ). Planos cristalinos de  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  indexados en el difractograma. Posiciones de Bragg, (I) estructura  $Fd\bar{3}m$  y (II) estructura  $R\bar{3}c$ .

Dicha figura refleja el perfil experimental ( $Y_{\text{exp}}$ ) del difractograma, el perfil ajustado por el refinamiento de Rietveld ( $Y_{\text{cal}}$ ), la diferencia entre los perfiles ( $Y_{\text{exp}} - Y_{\text{cal}}$ ) y las posiciones de Bragg de ambas estructuras.

Los picos de difracción se han indexado como correspondientes a la estructura cúbica de la ferrita de cobalto ( $Fd\bar{3}m$ : 227) y a la estructura romboédrica de la hematita ( $R\bar{3}c$ : 167), lo que de nuevo confirma la presencia de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en el material sintetizado en estas condiciones ( $\text{CoFe}(50:100)\text{mA}$  y 60 °C). La proporción obtenida del ajuste de ambas fases en la muestra fue 87.4(6)% ferrita de cobalto y 12.6(2)% hematita, proporciones que concuerdan con el análisis de TXRF (86.2%  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  y 13.8%  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).

Los resultados obtenidos del análisis del difractograma de rayos X de la muestra tratada térmicamente son semejantes a los obtenidos mediante el análisis termogravimétrico (ATG) y DSC del material en presencia de aire. En la Figura 6 se representa la pérdida de peso y el flujo de calor en función de la temperatura. El 2% de pérdida de peso inicial se corresponde con la deshidratación y pérdida del agua adsorbida sobre la superficie de las nanopartículas, y/o a la oxidación de las nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), proceso que ocurre a una temperatura inferior a 220 °C [5]. Esta reacción es considerada una reacción topotáctica donde la red cristalina mantiene la estructura de espinela, mientras los planos de oxígeno se adicionan, migrando parte de los cationes a la superficie, lo que proporciona en consecuencia una estructura tipo espinela con vacantes catiónicas [6]. Por otro lado el intenso pico exotérmico que se observa a 300 °C en la curva de DSC y la acusada pérdida de peso corresponden a la transición de fase de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  a  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  [7].

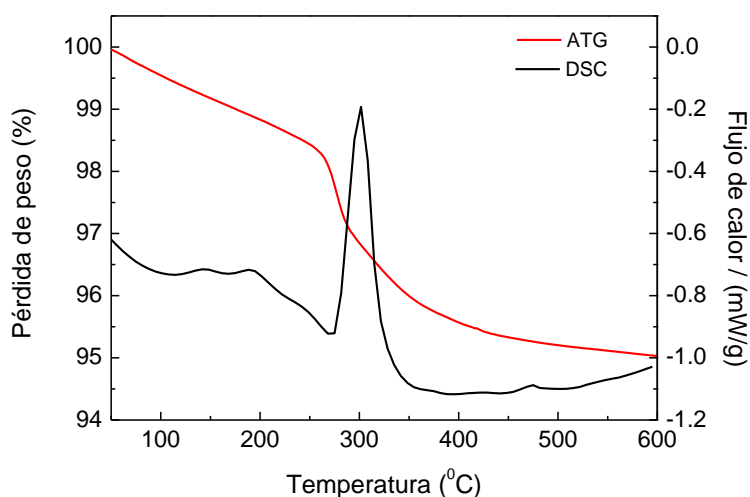


Figura 6. Análisis termogravimétrico y DSC de la muestra  $\text{CoFe}(50:100)\text{mA}-60^\circ\text{C}$ .

La tendencia evidenciada de que la cantidad de cobalto en el compuesto formado era directamente proporcional a la temperatura de síntesis, quedó finalmente corroborada cuando se eleva la temperatura de electrosíntesis a 80 °C, obteniendo en este caso la ferrita de cobalto estequiométrica. La relación molar catiónica obtenida por TXRF fue  $[\text{Fe}]/[\text{Co}] = 2.0$ . Los análisis de ATG y DSC de esta muestra sintetizada a 80 °C, Figura 7, no presentan ningún proceso de transformación de fase, confirmándose en este caso la síntesis de la ferrita de cobalto estequiométrica sin ningún tipo de impureza.

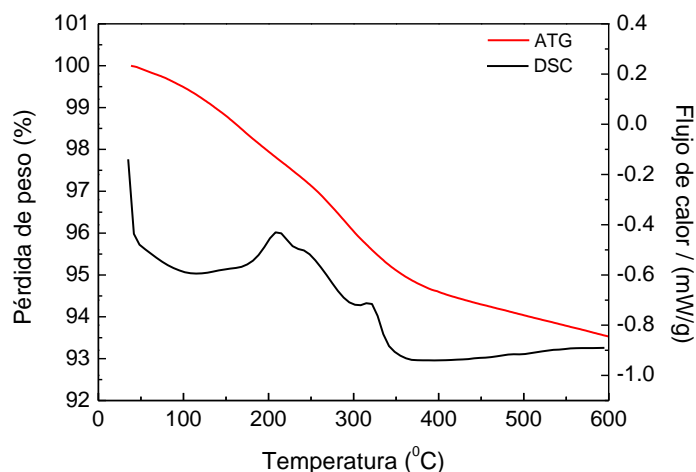


Figura 7. Análisis termogravimétrico y DSC de la muestra CoFe(50:100)mA-80°C.

Una vez obtenido el material estequiométrico, se procedió a caracterizarlo desde un punto de vista estructural y magnético. Como ya ha quedado reflejado en el capítulo 3, el cálculo de la distribución catiónica del Fe y el Co mediante el ajuste por el método de Rietveld a partir de un difractograma de rayos X, presenta serias dificultades ya que los factores de *scattering* de ambos elementos son semejantes. Mediante el refinamiento del difractograma solo se va a poder calcular con certeza el tamaño de cristal, las tensiones de red y los parámetros de red, ya que no dependen de las posiciones ocupadas por los átomos dentro de la celdilla, dejando sin refinar las ocupaciones de cada átomo.

En la Figura 8, se muestra el difractograma de rayos X de la muestra CoFe(50:100)mA-80°C, así como el resultado del refinamiento de la estructura por el método de Rietveld.

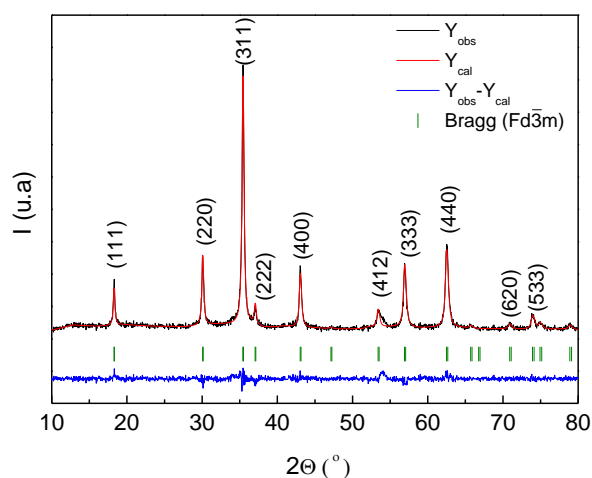


Figura 8. DRX de la muestra CoFe(50:100)mA-80°C. (I) Posiciones de Bragg de  $Fd\bar{3}m$ .  $R_{Bragg} = 6.30$ ,  $R_f = 3.99$ .



El parámetro de red determinado por el método de Rietveld para este material estequiométrico es  $8.399(4) \text{ \AA}$ . El tamaño de cristal y las tensiones de red determinadas también a partir del ajuste del perfil del difractograma son  $37 (1) \text{ nm}$  y  $0.170 (5) \text{ nm}$  respectivamente.

En la Figura 9b, se representa la dispersión de tamaño calculada a partir de las imágenes TEM de la Figura 9a. La gran desviación de tamaño de nanopartícula puede deberse a la escasa actuación del surfactante para inhibir la aglomeración de las mismas durante el proceso de síntesis, como se puede ver con claridad en la Figura 9a. Este hecho dificulta la medida de los tamaños por solapamiento de las nanopartículas. El rango de tamaños que se obtienen con estas condiciones de síntesis es muy polidisperso, obteniéndose valores en el rango entre  $20 \text{ nm}$  y  $90 \text{ nm}$ .

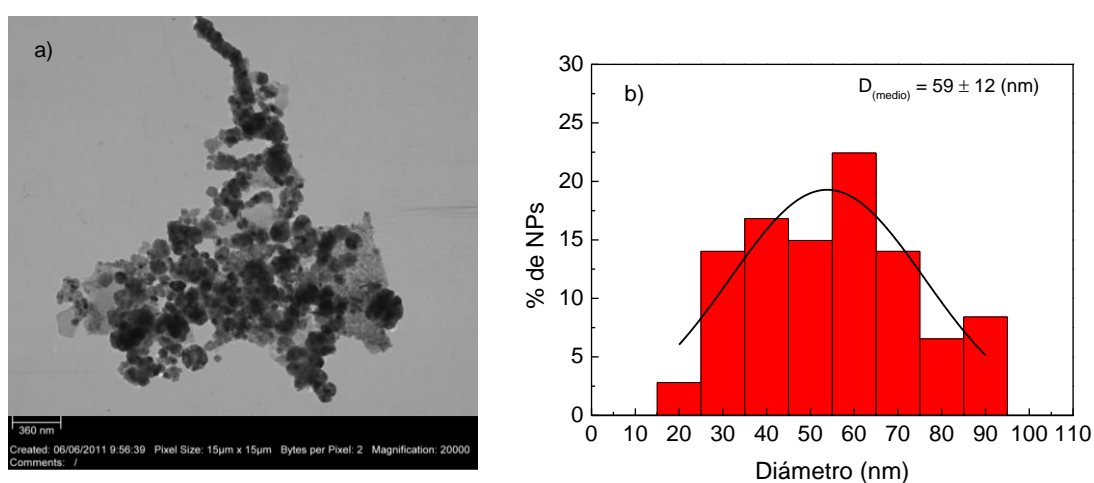


Figura 9. a) Micrografía electrónica de transmisión. b) Representación de la dispersión de tamaños calculado por TEM. Ambas de la muestra  $\text{CoFe}(50:100)\text{mA}-80^\circ\text{C}$ .

Si se comparan los tamaños de cristal calculados a partir del ajuste del perfil del difractograma por el método de Rietveld, con los determinados a partir del diámetro de nanopartícula medido en las micrografías electrónicas de transmisión (TEM) de  $59 \text{ nm}$ , Figura 9, se observa que estos tamaños no son muy acordes. La principal causa de esta diferencia en los valores de tamaño cristal y diámetro de nanopartícula, puede estar en el carácter policristalino de la muestra, ya que en materiales nanocristalinos, el término grano se utiliza para referirse a la fase cristalina más pequeña separada de otros por bordes de grano dentro de la misma partícula. Excepto en el caso de que cada nanopartícula sea un cristal único, en cuyo caso el tamaño de partícula y el de cristal son idénticos, el tamaño de partícula determinado por TEM es mayor prácticamente en todos los casos que el determinado por métodos de difracción. Dependiendo principalmente de las condiciones de síntesis las nanopartículas presentarán estructuras poli- o monocristalinas, Figura 10. De hecho, según el tamaño de partícula va convergiendo con el tamaño de cristal se obtienen estructuras menos policristalinas y más monocristalinas.

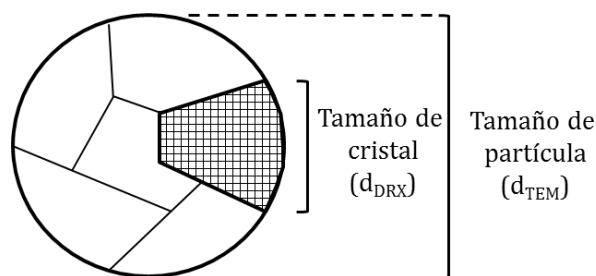


Figura 10. Diferencias entre diámetro de partícula y tamaño de cristal.

La caracterización magnética del material estequiométrico electrosintetizado se realizó midiendo los ciclos de histéresis a 298 y 5 K de la muestra (CoFe(50:100)mA-80°C), Figura 11. Los parámetros calculados a partir de las medidas magnéticas se encuentran recogidos en la Tabla 1.

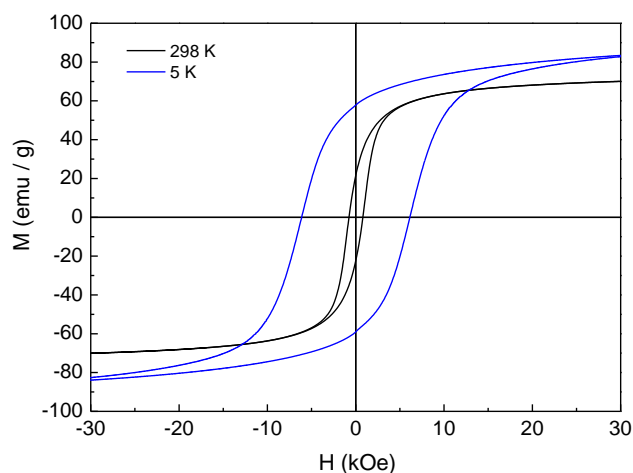


Figura 11. Ciclos de histéresis de la muestra CoFe(50:100)mA-80°C a 298 y 5 K.

La forma de los ciclos es típica de los materiales con comportamiento ferromagnético, además valores de  $H_c$  y  $M_r$  tan elevados indican que las nanopartículas mantienen cierto momento magnético cuando el campo magnético externo deja de aplicarse, comportamiento propio de materiales ferromagnéticos duros.

Tabla 1. Resumen de los parámetros magnéticos del  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  estequiométrico, muestra CoFe(50:100)mA-80°C.

T (K)	$H_c$ (Oe)	$M_s$ (emu/g)	$M_r/M_s$
298	823	74	0.30
5	6153	94	0.61

La coercitividad a 5 K es notablemente más elevada que a 298 K debido a que a baja temperatura con la disminución de la energía térmica, se inhibe el alineamiento de los momentos magnéticos en la dirección del campo aplicado. La relación de  $M_r/M_s$  aporta una idea de si el material se comporta como una estructura monodominio o no. Según el modelo de Stoner –Wohlfarth [8], una relación próxima a 0.5 es debida a una distribución aleatoria de partículas uniaxiales no interaccionantes, mientras que relaciones inferiores a 0.1 son típicas de estructuras multidominio. La relación  $M_r/M_s$  de la muestra (CoFe(50:100)mA-80°C) presenta un valor de 0.3 a 298 K y de 0.61 a 5 K, lo que indica que esta está constituida fundamentalmente por partículas uniaxiales.

Se han registrado espectros Mössbauer a 298 y 77 K, de la muestra estequiométrica CoFe(50:100)mA-80°C, Figura 12. El espectro de temperatura ambiente muestra dos sextetes debidos a la interacción magnética hiperfina del  $\text{Fe}^{3+}$  en cada una de las dos posiciones de la estructura, ambos subespectros se encuentran solapados.

Los valores de los parámetros de desplazamiento isomérico ( $\delta$ ) y campo magnético hiperfino ( $H_{\text{hf}}$ ) correspondientes, Tabla 2, están en buen acuerdo con los recogidos en la bibliografía para ferritas de tamaños similares, siendo ligeramente inferiores los valores de campo hiperfino que los correspondientes al *bulk*, cuyo campo promedio a temperatura ambiente es 51.6 T [9].

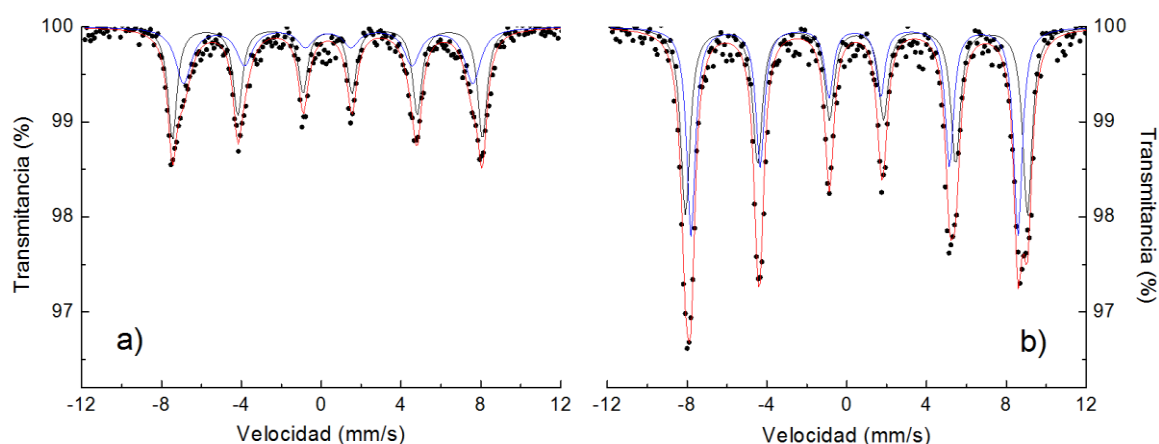


Figura 12. Espectros Mössbauer de la muestra CoFe(50:100)mA-80°C. a) 298 K, b) 77 K.

La asignación de cada sextete a los sitios A o B se hizo en base a los valores de desplazamiento isomérico y campo magnético hiperfino obtenidos, ya que en general los de menor valor corresponden a los sitios A y los de mayor valor a los sitios B [9]. La distribución catiónica del  $\text{Fe}^{3+}$  entre la posición tetraédrica y octaédrica de la estructura, se determina a partir de las áreas de los subespectros, suponiendo que el factor de Lamb-Mössbauer es el mismo en ambas posiciones. La proporción de  $\text{Fe}^{3+}$  en posición B es del 52% y 48% en A.

Tabla 2. Parámetros Mössbauer de la muestra CoFe(50:100)mA-80°C medido a 298 K y 77 K.

		$\delta^*$ (mm/s)	QS (mm/s)	$H_{hf}$ (T)	%
298K	Oh(B)	0.20(2)	0.01(1)	48.1(7)	58(1)
	Td(A)	0.24(2)	0.01(4)	44.9(3)	42 (2)
77K	Oh(B)	0.378(5)	0.01(1)	53.1(5)	52 (1)
	Td(A)	0.285(5)	0.016(9)	50.7(4)	48(1)

\*Desplazamiento isomérico ( $\delta$ ) relativo al baricentro del espectro de una lámina de  $\alpha$ -Fe de 6  $\mu$ m.

## Conclusiones

Se ha demostrado que la temperatura tiene un efecto importante en la electrosíntesis de ferritas de cobalto. Fijando parámetros tales como la intensidad de corriente, área de electrodos, separación de los mismos, agitación y tiempo de síntesis se ha podido valorar el efecto de la temperatura en el proceso. La conclusión a la cual se ha podido llegar es que la inclusión de  $\text{Co}^{2+}$  dentro de la red cúbica de la ferrita esta favorecida con el aumento de la temperatura, seguramente producido por una mayor liberación de iones cobalto en la disolución, con lo que es posible la obtención del material estequiométrico. Además un aumento de T favorece el crecimiento de las partículas. Sin embargo, la síntesis a altas temperaturas (80 °C) produce una mayor agregación de las nanopartículas y una gran dispersión de tamaños, de modo que el surfactante no muestra una gran eficacia. Por este motivo, se procedió a explorar a una temperatura inferior (25 y 60 °C) el efecto de las intensidades de corriente aplicadas a los electrodos, buscando liberar la cantidad exacta de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  a la disolución y así poder obtener los compuestos estequiométricos pero con menor dispersión de tamaño.

### 4.1.3 Efecto de la intensidad de corriente aplicada

#### 4.1.3.1 Síntesis a 60 °C

Como se mostró en el epígrafe 4.1.2, la síntesis con corrientes de 50:100 mA aplicadas al Co y al Fe a 60 °C producía mezcla de ferrita de cobalto y de magnetita con una relación de  $[\text{Fe}]/[\text{Co}]$  de 2.5. De modo que a priori un reducción de la cantidad de iones de hierro liberados en el medio de síntesis tendría que dar lugar una relación inferior a la ya referida. Para ello, se redujo la intensidad aplicada a la lámina de hierro hasta 90 mA, manteniendo constante, la intensidad de corriente

aplicada al Co en 50 mA, la agitación (1100 rpm), el tiempo de síntesis (30 minutos), el área y disposición de electrodos (disposición 2) y la temperatura de trabajo en 60 °C.

Los análisis de TXRF del material CoFe(50:90)mA-60°C corroboraron la obtención del producto estequiométrico, con la esperada relación molar [Fe]/[Co] de 2.0. Las curvas de termogravimetría, Figura 13, muestran una pérdida constante de peso de aproximadamente un 6% en el rango de temperatura ensayado, debido a la pérdida de agua absorbida y la oxidación del surfactante. No aparece ninguna pérdida de peso pronunciada en torno a 300 °C como ocurría en la muestra CoFe(50:100)mA-60°C (Figura 6), en la que se confirmó la presencia de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> como subproducto de la síntesis. Este fenómeno tampoco es apreciable en el ensayo de calorimetría diferencial de barrido.

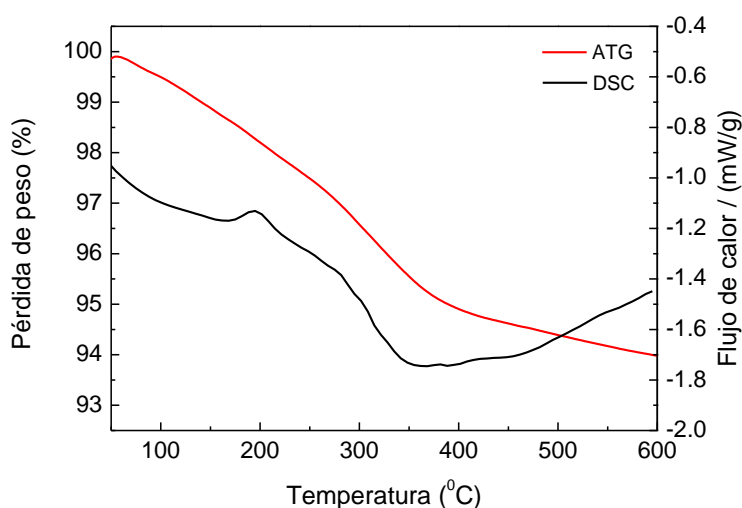


Figura 13. Análisis termogravimétrico y DSC de la muestra CoFe(50:90)mA-60°C.

El difractograma del producto obtenido bajo estas condiciones de síntesis se muestra en la Figura 14, no observándose reflexiones diferentes a las de un compuesto con estructura cúbica, como es la ferrita de cobalto. El parámetro de red calculado es 8.407(4) Å. El tamaño de cristal y las tensiones de red son 30.1 (9) nm y 0.19 (6) nm respectivamente.

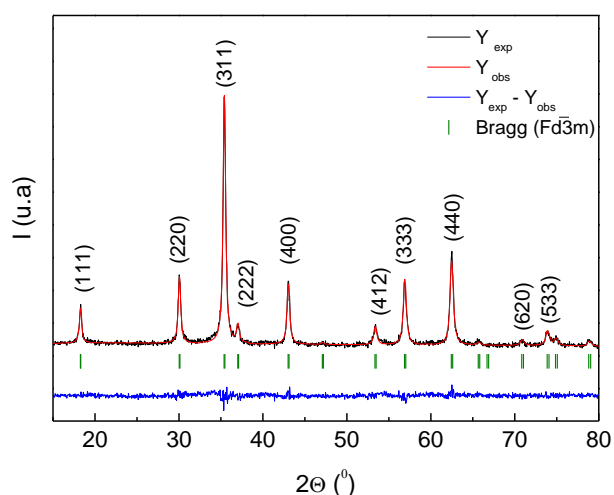


Figura 14. Difractograma de rayos X de la muestra  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}$ .  $R_{\text{Bragg}} = 3.984$ ,  $R_f = 2.957$ . (I) Posiciones de Bragg de la estructura  $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$ .

Para descartar la presencia de otras fases, se calentó la muestra durante 16 h a  $600^\circ\text{C}$  en presencia de  $\text{O}_2$  y se midió el difractograma de rayos X, Figura 15.

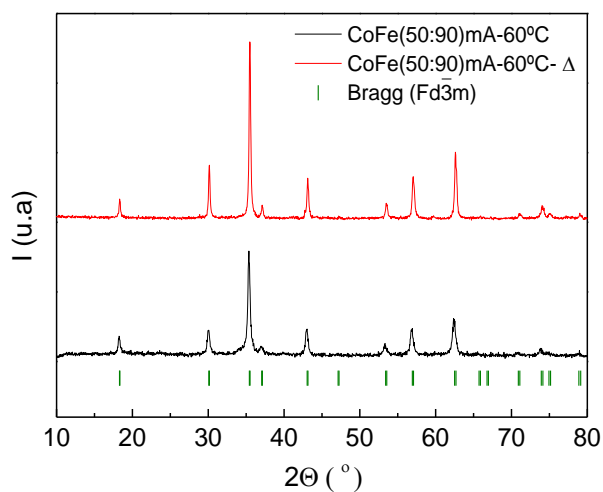


Figura 15. Difractograma de rayos X de la muestra  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}$ , sin tratar (negro) y tratada (rojo). (I) Posiciones de Bragg de la estructura  $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$ .

En el difractograma tan solo se aprecia un aumento de las intensidades producido al calentar la muestra por aumento de la cristalinidad, pero no aparece otra fase como ocurría en el caso de ferritas no estequiométricas.

El valor del tamaño de partícula medido en las micrografías TEM es  $36 \pm 5$  nm, (Figura 16), próximo al tamaño de cristal obtenido mediante DRX, demostrando así que la muestra estequiométrica sintetizada a  $60^\circ\text{C}$  es menos policristalina que la sintetizada a  $80^\circ\text{C}$ . En el caso de la síntesis a  $60^\circ\text{C}$  la polidispersidad de tamaño de partícula es más reducida, observándose valores en el rango entre 20 y 50 nm.

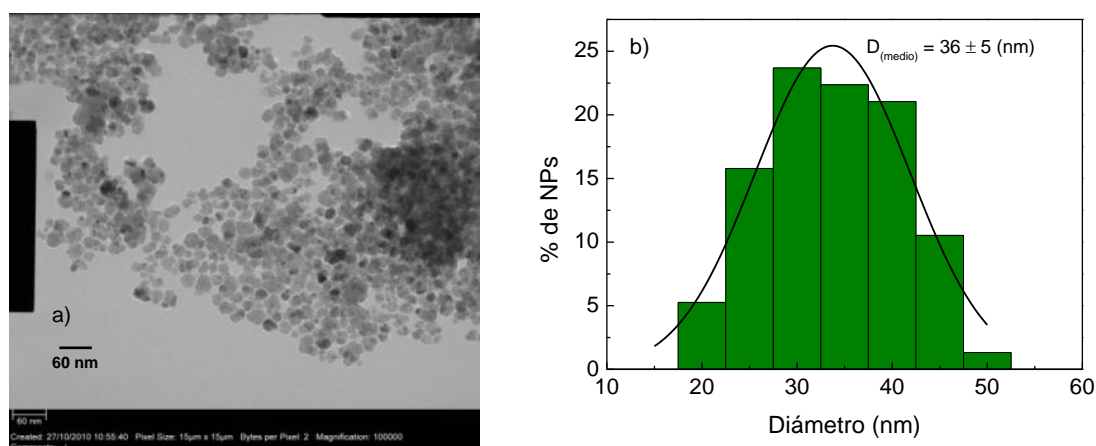


Figura 16. a) Micrografía electrónica de Transmisión a 100x. b) representación de la dispersión de tamaños de la muestra  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}$  a partir de la medida de TEM.

Los espectros de Mössbauer de la muestra  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}$  se muestran en la Figura 17.

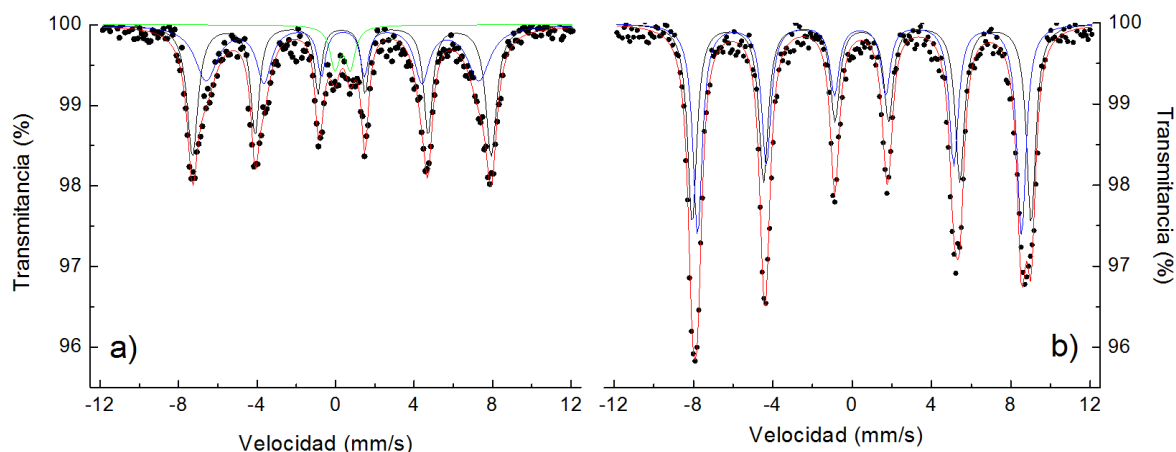


Figura 17. Espectros Mössbauer de la muestra  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}$ , a) a 298 K, b) a 77 K.

El espectro de temperatura ambiente (298 K), Figura 17a, muestra los dos sextetes debidos a la interacción magnética hiperfina del  $\text{Fe}^{3+}$  en cada una de las dos posiciones de la red (A y B), análogos a los mostrados en la Figura 12, correspondiente al material estequiométrico  $\text{CoFe}(50:100)\text{mA}-80^\circ\text{C}$ . Superpuesto a estos sextetes aparece un doblete de  $\text{Fe}^{3+}$  atribuible a las

nanopartículas de menor tamaño cuya temperatura de bloqueo se encuentra por debajo de 298 K, pero por encima de 77 K, motivo por el cual el doblete ya no se observa en el espectro de baja temperatura, Figura 17b. Aunque el solapamiento de ambos sextetes es muy notorio, una aproximación del ajuste de las áreas muestra una relación de  $\text{Fe}^{3+}$  de 52% en posiciones octaédricas y 48% en tetraédricas, según se resume en la Tabla 3, junto al resto de parámetros hiperfinos.

Tabla 3. Parámetros Mössbauer de la muestra  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}$ , medido a 298 K y 77 K.

		$\delta^*$ (mm/s)	QS (mm/s)	$H_{\text{hf}}$ (T)	%
298K	Oh (B)	0.202(6)	0.01(1)	47.1(1)	50(1)
	Td(A)	0.25(2)	0.02(3)	43.0(5)	43(7)
	doblete	0.24(3)	0.78(5)	-----	7(1)
77K	Oh(B)	0.371(4)	-0.006(8)	52.8 (4)	52(1)
	Td(A)	0.275(5)	-0.030(9)	50.5(4)	48(1)

\*Desplazamiento isomérico ( $\delta$ ) relativo al baricentro del espectro de una lámina de  $\alpha\text{-Fe}$  de  $6\mu\text{m}$ .

La comparativa de las curvas de magnetización a temperatura ambiente y 5 K de la muestra estequiométrica  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}$  (relación molar  $[\text{Fe}]/[\text{Co}] = 2.0$ ) y de la muestra  $\text{CoFe}(50:100)\text{mA}-60^\circ\text{C}$  (relación molar  $[\text{Fe}]/[\text{Co}] = 2.5$ ), se observan en la Figura 18.

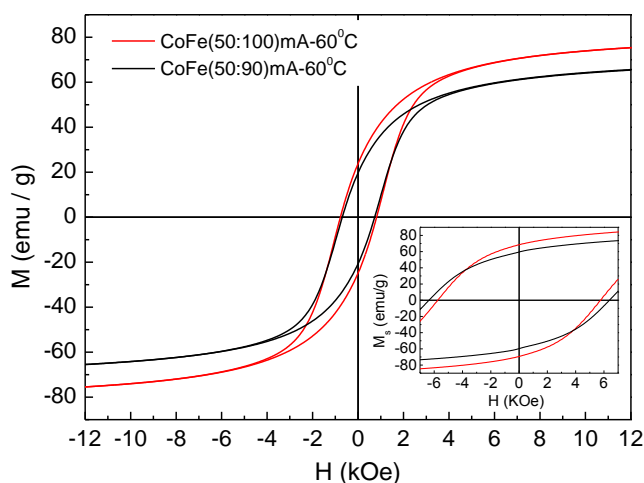


Figura 18. Ciclos de histéresis a 298 K de las muestras  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}$  y  $\text{CoFe}(50:100)\text{mA}-60^\circ\text{C}$  y a 5 K (en recuadro interior).

El comportamiento es típicamente ferromagnético a las dos temperaturas medidas, sin embargo la muestra  $\text{CoFe}(50:100)\text{mA}-60^\circ\text{C}$  presenta una  $M_s$  de 83.6 emu/g frente a  $M_s$  de 70 emu/g de la muestra  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}$ . Este resultado está en acuerdo con las proporciones halladas de



ferrita de cobalto (86.2%) y magnetita (13.8%) en la muestra CoFe(50:100)mA-60°C (análisis semicuantitativo de DRX sección 4.1.2, página 98) y los respectivos valores de  $M_s$  de la ferrita estequiométrica y de la magnetita (92 emu/g medido a 293 K). La muestra no estequiométrica presenta un  $\approx 14\%$  de aumento en la magnetización de saturación con respecto a la muestra estequiométrica de acuerdo con la presencia de magnetita. El valor de  $M_s$  de la muestra estequiométrica CoFe(50:90)mA-60°C es de 70 emu/g a 298 K y 87 emu/g a 5 K. La coercitividad aumenta según disminuye la temperatura de medida, desde 714 Oe hasta alcanzar los 6386 Oe a 5 K, Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros obtenidos de los ciclos de histéresis de la muestra CoFe(50:90)mA-60°C a 298 y 5 K.

T (K)	H <sub>c</sub> (Oe)	M <sub>s</sub> (emu/g)	M <sub>r</sub> /M <sub>s</sub>
298	714	70	0.26
5	6386	87	0.60

## Conclusiones

La reducción de la intensidad aplicada al hierro de 100 mA a 90 mA da lugar por tanto a la obtención de ferrita estequiométrica de menor tamaño que la sintetizada a 80 °C. El menor tamaño obtenido en esta ocasión es principalmente atribuible a la disminución de la temperatura de síntesis (60 °C) más que a la disminución de intensidad, ya que los tamaños de partícula de la muestra estequiométrica CoFe(50:90)mA-60°C y de la muestra no estequiométrica CoFe(50:100)mA-60°C son  $36 \pm 5$  nm (Figura 16) y  $37 \pm 4$  nm respectivamente (no se muestra), no observándose claras diferencias, en cuanto al tamaño se refiere, por la reducción de 100 mA a 90 mA en la oxidación de la lámina de hierro.

### 4.1.3.2 Síntesis a 25 °C

Con el objetivo de sintetizar ferritas de cobalto estequiométricas a 25 °C, para simplificar la síntesis al no tener que mantener termostatzado el sistema, se varió como en la sección anterior la intensidad de corriente aplicada a la lámina de hierro. En este caso, la intensidad aplicada al Fe se redujo a 80 mA. Mediante TXRF se corroboró que la proporción de moles de hierro respecto a cobalto era de 2.0. El difractograma de rayos X de la muestra CoFe(50:80)mA-25°C se presenta en la Figura 19, donde todas las reflexiones corresponden con la estructura espinela de la ferrita de cobalto. Del refinamiento del perfil de rayos X por el método de Rietveld se obtuvieron valores de

parámetro de red de 8.398(4) Å, de tamaño de cristal de 12.89 (4) nm y de tensiones de red de 0.35 (1) nm.

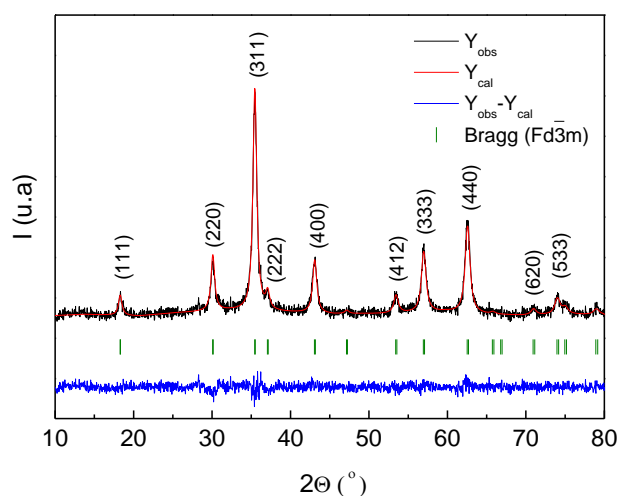


Figura 19. Difractograma de rayos X de la muestra  $\text{CoFe}(50:80)\text{mA}-25^\circ\text{C}$ . Refinamiento por el método de Rietveld y (I) posiciones de Bragg de la estructura  $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$ .  $R_{\text{Bragg}} = 4.91$ ,  $R_f = 3.40$ .

El difractograma de la muestra calentada durante 16 h a 600 °C, Figura 20, muestra un aumento de la intensidad de los picos por efecto de la temperatura y corrobora la formación de la  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  estequiométrico, ya que no muestra ninguna reflexión nueva producto de la oxidación.

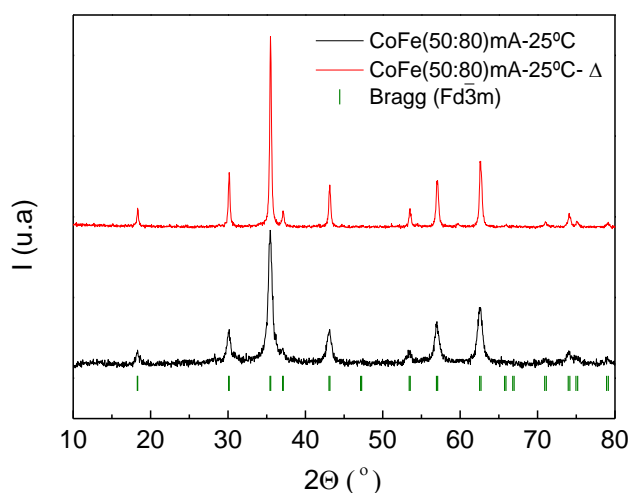


Figura 20. Difractograma de rayos X de la muestra  $\text{CoFe}(50:80)\text{mA}-25^\circ\text{C}$  (negro) y calentada a 600 °C al aire durante 16 h (rojo). (I) Posiciones de Bragg de la estructura  $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$ .

En cuanto al tamaño de nanopartícula determinado en las micrografías electrónicas de transmisión, a partir de la medida del diámetro de al menos 100 partículas, es  $22 \pm 4$  nm en la muestra CoFe(50:80)mA-25°C, la representación de la dispersión de tamaños y la imagen de TEM se puede observar en la Figura 21. Con la síntesis a 25 °C se confirma de nuevo que la temperatura afecta a la polidispersidad de las NPs, obteniéndose en este caso una menor polidispersidad, en un rango que abarca desde 15 nm hasta 32 nm de diámetro.

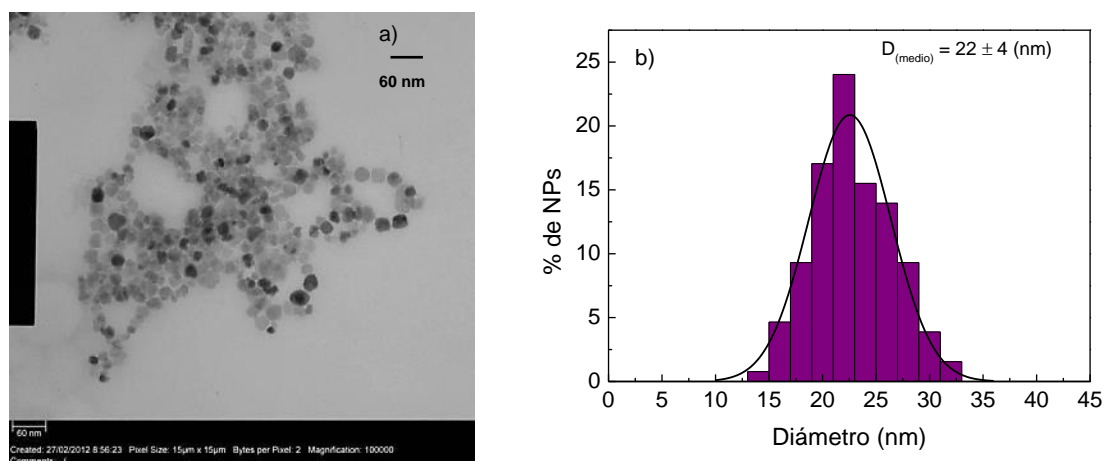


Figura 21. a) Micrografía electrónica de transmisión a 100x. b) representación de la dispersión de tamaños calculado por TEM. Ambas de la muestra CoFe(50:80)mA-25°C.

El tamaño de las nanopartículas obtenidas a 25 °C, menor que a temperaturas superiores, va a afectar claramente en las propiedades magnéticas del material (Figura 22, Tabla 5), alcanzando valores de  $M_s$  y  $H_c$  a 298 K inferiores a las dos ferritas de cobalto estequiométricas descritas con anterioridad, Tabla 1 y Tabla 4.

Tabla 5. Parámetros obtenidos de los ciclos de histéresis de la muestra CoFe(50:80)mA-25°C a 298 y 5 K

T (K)	$H_c$ (Oe)	$M_s$ (emu/g)	$M_r/M_s$
298	346	60.7	0.20
5	7427	74.7	0.62

La disminución en la coercitividad a temperatura ambiente (ver página 105 y 112) es debida a que al disminuir el volumen de la nanopartícula la barrera de anisotropía es menor y por tanto se necesita menor campo para invertir la magnetización de las partículas.

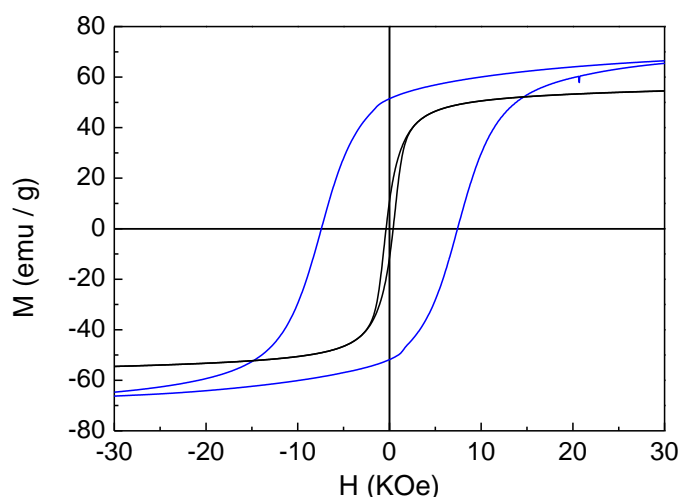


Figura 22. Ciclos de histéresis de la muestra  $\text{CoFe}(50:80)\text{mA}-25^\circ\text{C}$  a 298 K (negro) y 5 K (azul).

La presencia de las partículas de menor tamaño, valor estimado en 5-6 nm [10, 11], da lugar a la aparición del doblete superparamagnético de  $\text{Fe}^{3+}$  en el espectro de Mössbauer a temperatura ambiente, Figura 23a, mientras que a 77 K aparecen exclusivamente los dos sextetes, ya que a esta temperatura también las nanopartículas de menor tamaño se encuentran bloqueadas desde un punto de vista magnético, Figura 23b.

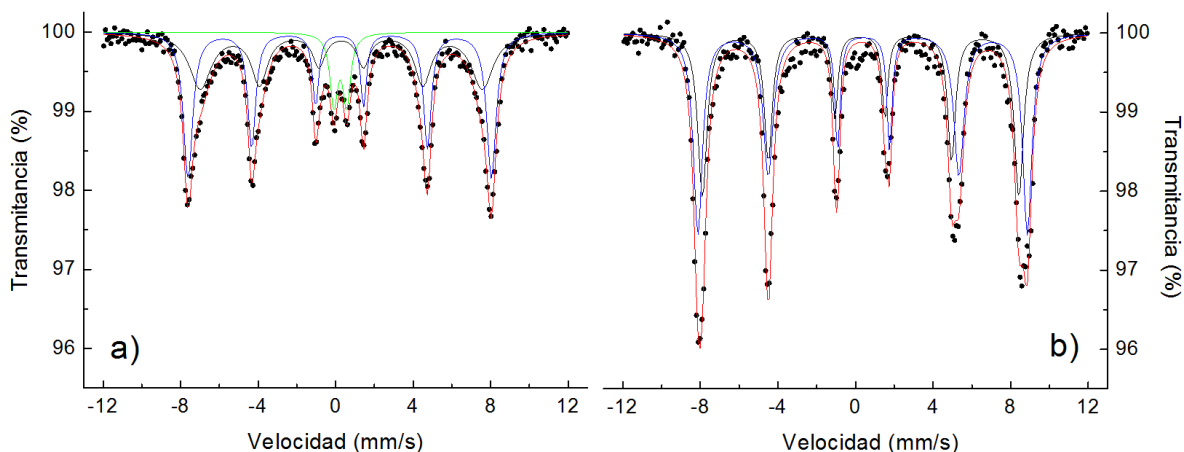


Figura 23. Espectros Mössbauer de la muestra de  $\text{CoFe}(50:80)\text{mA}-25^\circ\text{C}$ . a) 298 K, b) 77 K.

Los parámetros resultantes de los ajustes de los espectros Mössbauer se encuentran resumidos en la Tabla 6. En este caso, el área del doblete a 298 K es mayor que el obtenido en el

espectro de la muestra estequiométrica sintetizada a 60 °C (Tabla 3) debido a la mayor abundancia de NPs con menor tamaño.

Tabla 6. Parámetros Mössbauer de la muestra  $\text{CoFe}(50:80)\text{mA}$ -25°C, medido a 298 y 77 K.

		$\delta^*$ (mm/s)	QS (mm/s)	$H_{\text{hf}}$ (T)	%
<b>298K</b>	Oh (B)	0.208(3)	0.007(6)	48.5(4)	48(1)
	Td (A)	0.29(1)	0.01(2)	45.1(3)	43(1)
	Doblete	0.238(8)	0.66(2)	-----	9(1)
<b>77K</b>	Oh (B)	0.390(4)	0.051(7)	52.6(3)	56(1)
	Td (A)	0.245(4)	0.037(8)	50.6(4)	44(1)

\*Desplazamiento isomérico ( $\delta$ ) relativo al baricentro del espectro de una lámina de  $\alpha\text{-Fe}$  de  $6\mu\text{m}$ .

Los valores de los parámetros hiperfinos: desplazamiento isomérico, desdoblamiento cuadrupolar y campo magnético hiperfino correspondientes a los espectros Mössbauer de las muestras estequiométricas sintetizadas a diferentes temperaturas, (Tabla 2, Tabla 3, Tabla 6) son iguales, dentro de la precisión de la medida, lo que indica que la distribución catiónica y los entornos del Fe en la red deben ser muy similares.

## Conclusiones

Las conclusiones derivadas de la disminución de la intensidad de corriente aplicada al Fe para una temperatura de síntesis de 25 °C son las ya descritas para la síntesis a 60 °C. Se necesita reducir la intensidad aplicada a la lámina de Fe de 100 mA a 80 mA para obtener NPs estequiométricas. La temperatura de síntesis principalmente afectará al tamaño de las NPs mientras que la disminución de corriente para una misma temperatura solo afecta a la estequiometría y no al tamaño de las mismas.

### 4.1.4 Efecto de la agitación magnética

Resulta de vital importancia para la formación de ferrita de cobalto por vía electroquímica, que el desplazamiento a través del seno de la disolución de los iones liberados en el medio electrolítico debido a los procesos de oxidación y reducción de los electrodos sea lo más rápido posible. Estos iones liberados reaccionarán en el medio para finalmente formar el producto deseado,

por tanto la velocidad a la cual la disolución sea agitada va a afectar en gran medida el producto final que se vaya a obtener.

Para comprobar este hecho se partió de las condiciones de síntesis de la muestra estequiométrica a 60 °C (a modo de recordatorio: intensidad aplicada al Fe de 90 mA, al Co de 50 mA, tiempo de síntesis 30 minutos y disposición 2 de electrodos) y se estudió el efecto de la disminución de la agitación desde 1100 rpm a 700 y 400 rpm. Los difractogramas de rayos X de los materiales obtenidos con las tres velocidades de agitación se pueden observar en la Figura 24. En todos los difractogramas se comprueba que se produce la síntesis de un compuesto con estructura espinela, asignado a la ferrita de cobalto, para cualquiera de las velocidades de agitación estudiadas, sin embargo cuando la velocidad de agitación es 400 o 700 rpm algunos de los picos de difracción no pueden asignarse exclusivamente a esta estructura. El análisis de estos difractogramas muestra la coexistencia de productos intermedios de reacción o impurezas del tipo, (\*) – oxihidróxido de Fe y Co  $[(Fe_xCo_y)OOH]$ , ( $\theta$ ) – goetita  $[FeO(OH)]$ , ( $\Delta$ ) – oxihidróxido de cobalto ( $HCoO_2$ ) y ( $\phi$ ) – hidróxido de hierro  $[Fe(OH)_3]$ .

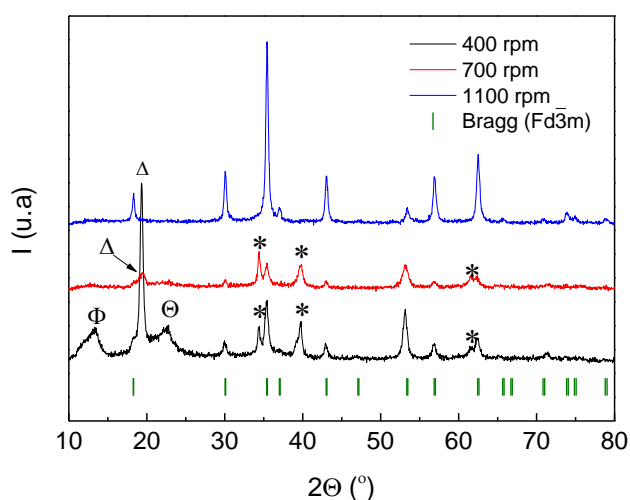


Figura 24. Difractogramas de rayos X de la muestra  $CoFe(50:90)mA-60^{\circ}C$  sintetizadas con agitación de 400, 700 y 1100 rpm. (I) Posiciones de Bragg de la estructura  $Fd\bar{3}m$ .

Las micrografías electrónicas de transmisión de las muestras sintetizadas bajo agitación de 400 rpm y 700 rpm, Figura 25, muestran la presencia de estas impurezas en forma de cristales aciculares y cristales bipiramidales con forma laminar, ambos de goetita [12].

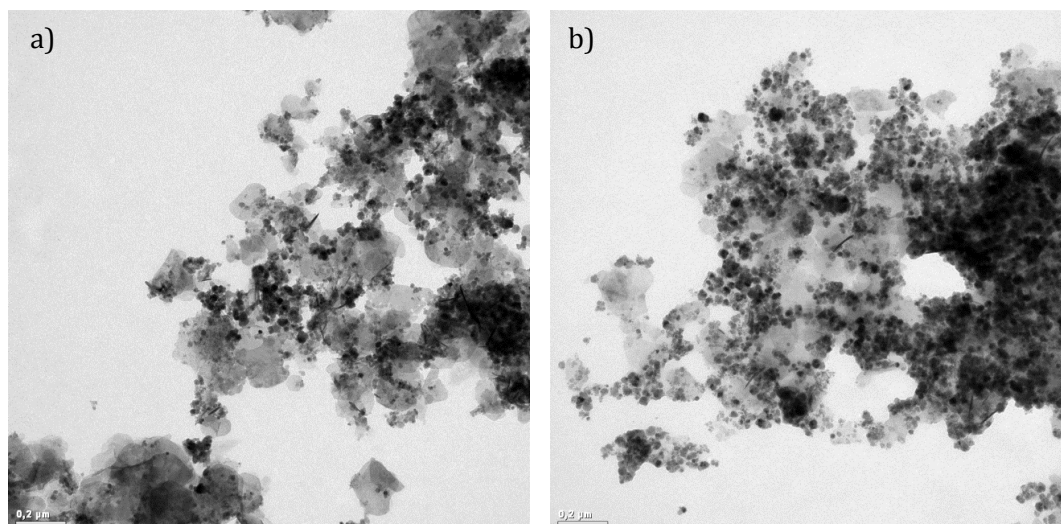


Figura 25. TEM de la muestra  $\text{CoFe}(50:90)\text{MA-60}^\circ\text{C}$ , a) bajo agitación de 400 rpm y b) 700 rpm.

## Conclusiones

Mediante el estudio del efecto de la agitación magnética queda comprobado que una agitación vigorosa es imprescindible para que durante el proceso electroquímico se reduzcan en el cátodo los oxihidróxidos de hierro y cobalto formados durante las primeras etapas del proceso y se pueda sintetizar la ferrita de cobalto sin impurezas.

De modo general, se puede concluir que, se ha desarrollado y optimizado un nuevo método de síntesis de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  basado en la electrooxidación de láminas de hierro y cobalto y posterior reducción de los oxihidróxidos de los metales formados. La variación de los parámetros de síntesis que controlan el proceso, permiten obtener nanopartículas estequiométricas de tamaños diferentes.

## 4.2 Relación del Tamaño de las NPs y su Respuesta Magnética.

Al comparar el comportamiento magnético de diferentes muestras, hay que tener en cuenta una serie de circunstancias que pueden modificar dicho comportamiento, como son: (i) la presencia de impurezas cuyo comportamiento magnético sea diferente al de las ferritas, (ii) el tamaño de cristal de las NPs, (iii) la distribución de los cationes en la red y (iv) las posibles modificaciones en los estados de oxidación de los cationes, que afectarían a los momentos magnéticos de cada átomo [13].

En relación a los aspectos mencionados, las muestras que se van a comparar presentan la misma estequiometría, sin impurezas, con una distribución de iones hierro calculada por espectroscopia Mössbauer muy semejante, y asumiendo que los estados de oxidación de los cationes son  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  en todos los casos, por lo que las diferencias de comportamiento magnético se deberán por tanto mayoritariamente a la variación del tamaño de partícula de las muestras.

### 4.2.1 Dependencia de $H_c$ con el tamaño de partícula

Como ya se ha descrito en el Capítulo 1, existe una dependencia del campo coercitivo con el tamaño de las NPs tal y como describe la Figura 4 del Capítulo 1, página 10.

Por tanto para analizar la relación de la coercitividad con el tamaño de partícula de las tres ferritas de cobalto estequiométricas, se ha estimado el valor de  $D_c$  mediante la ecuación 4.1 [14] utilizando los valores referidos a la ferrita de cobalto *bulk* a 298 K.

$$D_c = \frac{18\sqrt{A_{ex}K}}{\mu_0 M_s^2} \quad (4.1)$$

dónde,  $A_{ex}$  es la constante de intercambio,  $K$  la constante de anisotropía magnética,  $M_s$  la magnetización de saturación y  $\mu_0$  la permeabilidad en el vacío. Tomando los valores bibliográficos para la ferrita de cobalto *bulk*, de  $K = 2.10^5 \text{ J/m}^3$ ,  $M_s = 4,23.10^5 \text{ A/m}$  (80 emu/g), y  $A_{ex} = 3,22.10^{-12} \text{ J/m}$  [15, 16] se obtiene un valor de  $D_c \approx 64 \text{ nm}$ . Este valor es próximo a los  $59 \pm 12 \text{ nm}$  de diámetro de partícula de la muestra  $\text{CoFe}(50:100)\text{mA}-80^\circ\text{C}$ .

Para calcular el diámetro de separación entre la región superparamagnética y la ferromagnética ( $D_{sp}$ ) se ha utilizado la ecuación (4.2) y los valores de la ferrita de cobalto *bulk*. Obteniéndose un valor de  $D_{sp} \approx 10 \text{ nm}$ .



$$V_{sp} = \frac{25K_B T}{K} \quad (4.2)$$

La representación de la coercitividad en función del tamaño de partícula para las 3 muestras estequiométricas a 5 y 298 K se muestra en la Figura 26.

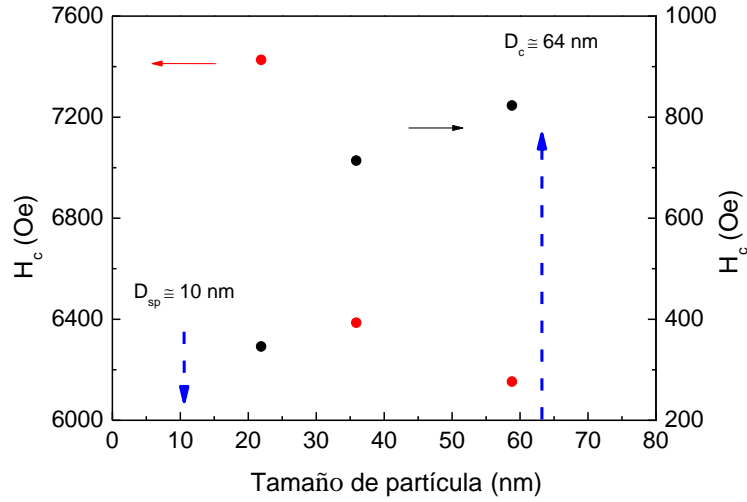


Figura 26. Relación de  $H_c$  con el tamaño de partícula de las muestras estequiométricas medido a 5 K (rojo) y 298 K (negro). Se señalan los valores de  $D_c$  y  $D_{sp}$  para la ferrita de cobalto.

La variación del campo coercitivo con el tamaño de partícula a 298 K, muestra un aumento de  $H_c$  al aumentar el tamaño aproximándose a la zona de saturación que marcaría la frontera entre la región monodominio y multidominio. Este aumento de  $H_c$  es debido a que al aumentar el volumen de la partícula, aumenta la barrera de anisotropía según la ecuación (4.3);

$$E_a = KV \sin^2 \theta \quad (4.3)$$

dónde  $\theta$  es el ángulo formado por el momento magnético ( $\mu$ ) y el eje de fácil imanación,  $K$  es la constante de anisotropía efectiva y  $V$  es el volumen de la partícula, por tanto al aumentar el tamaño se necesita un mayor campo para superar la barrera de anisotropía e invertir los momentos magnéticos de las NPs. Aunque el tamaño medio de nanopartícula de la muestra CoFe(50:100)mA-80°C medido por TEM es de  $59 \pm 12$  nm, existen gran cantidad de nanopartículas que superan el  $D_c$  calculado en 64 nm, y por tanto entrarían dentro de la región multidominio, por ello la coercitividad de esta muestra se aproxima al valor de saturación.

La Figura 26, también muestra la coercitividad medida a 5 K y su evolución con el tamaño de partícula que es notablemente diferente a su evolución a 298 K. A baja temperatura el  $H_c$  disminuye a

medida que aumenta el tamaño. El mayor  $H_c$  obtenido para las NPs más pequeñas a 5 K, indica un aumento en la anisotropía, que suele atribuirse a efectos superficiales [17, 18]. Este efecto de la modificación de la anisotropía superficial se hace más importante a medida que disminuye el tamaño de partícula puesto que aumenta la relación superficie/volumen. Este tipo de dependencia no se observa a 298 K, probablemente porque la energía térmica anula las interacciones entre las capas superficiales de espines y porque estas deben ser muy débiles de forma que sólo se observan a temperaturas muy bajas. Por último, en la Figura 26, para un mismo tamaño y comparando la coercitividad a 5 y 298 K se observa que al aumentar la temperatura disminuye el campo coercitivo, es decir, la energía térmica favorece la rotación del momento magnético de la partícula en la dirección del campo.

#### 4.2.2 Dependencia de $M_s$ con el tamaño de partícula.

La magnetización de saturación de las tres muestras estequiométricas sintetizadas electroquímicamente se encuentra por debajo del valor de magnetización de saturación de la ferrita de cobalto masiva (80 emu/g y 92 emu/g a 298 y 0 K respectivamente [16]), como muestra la Tabla 7, a excepción de la  $M_s$  de la muestra sintetizada a 80 °C que alcanza 98 emu/g a 5 K, valor que se encuentra dentro del error de la medida.

Similares valores de  $M_s$  a 298 K se encuentran en la literatura para ferritas de cobalto estequiométricas de tamaño también similar, sintetizadas con el método de co-precipitación. Kim et al. obtuvieron valores de  $M_s$  de 58.3 emu/g y  $H_c$  de 193 Oe a 298 K para NPs de tamaño de cristal de 13.8 nm [19]. Gyergyek y col. compararon las propiedades magnéticas según diferentes métodos de síntesis, para el caso concreto de la co-precipitación obtuvieron valores de  $M_s$  de 57 emu/g para un tamaño de cristal de 8.7 nm a 298 K [20]. Zi y col. hallaron una  $M_s$  de 61.77 emu/g para nanopartículas de 9 nm a 298 K [21]. Chinnasamy y col. publicaron una saturación de 63 emu/g para NPs de 18 nm [22]. Partículas de mayor tamaño se obtuvieron por el método combustión con una  $M_s$  de 66 emu/g para NPs de 40 nm a 298 K [23]. En cambio por el método solvotermal se obtuvieron NPs de 16 nm con  $M_s$  a 298 K de 55 emu/g [24]. Las nanopartículas más pequeñas se obtuvieron en descomposición en medio orgánico con diámetro de 6 nm y  $M_s = 70$  emu/g a 298 K [25].

Tabla 7. Valores de  $M_s$  de las tres muestras estequiométricas sintetizadas electroquímicamente a 25,60 y 80 °C respectivamente.

	$M_s$ (emu/g)		$M_r/M_s$		$t$ (nm)
	298 K	5 K	298 K	5 K	
25 °C	60.7	74.7	0.20	0.62	0.88
60 °C	70	87	0.26	0.60	0.75
80 °C	74	98	0.30	0.59	0.73

De la relación lineal de la inversa de diámetro de partícula con la  $M_s$  a 298 K se ha hallado la magnetización de saturación del *bulk* en el punto de corte con el eje y, se obtiene un valor de 82 (1) emu/g, próximo al valor de 80 emu/g a 298 K encontrado en la literatura [16]. Esta dependencia lineal puede explicarse mediante la presencia en la superficie de las NPs de una “*dead layer*” o capa con diferente ordenamiento magnético que no contribuye a la magnetización [26], ecuación (4.4):

$$M_s = M_s(bulk) \left[ 1 - \frac{6\delta}{D} \right] \quad (4.4)$$

dónde  $\delta$  es el espesor de la “*dead layer*”,  $M_s$  es la magnetización de cada muestra estequiométrica,  $M_s(bulk)$  la magnetización del *bulk* a 298 K y  $D$ , el tamaño de partícula determinado por TEM. El espesor de la “*dead layer*” ( $t$ ), calculado a 298 K se muestra en la Tabla 7.

La contribución de esta “*dead layer*” al volumen total de las NPs es mayor en las de menor tamaño, siendo aproximadamente el 11,5% del volumen total de las NPs sintetizadas a 25 °C lo que provoca una disminución importante en el valor de saturación. Mientras que para las NPs sintetizadas a 60 °C y 80 °C constituye aproximadamente un 6 y un 3% del volumen total respectivamente. La existencia de esta capa con orden magnético diferente puede ser causada por la existencia de *spin canting* en los átomos de la superficie [27], o por la pérdida del orden a largo alcance en la capa superficial [28-30].

#### 4.2.3 Dependencia de la relación $M_r/M_s$ con el tamaño de partícula

Stoner and Wohlfarth demostraron que cuando las NPs presentan anisotropía uniaxial, la magnetización de remanencia equivale a  $M_r=0.5M_s$  [8], siendo rigurosamente válido para  $T = 0$  K y con NPs perfectamente orientadas a lo largo del campo magnético aplicado [31]. En cambio, para el caso de nanopartículas esféricas con anisotropía magnetocristalina cúbica, la magnetización de remanencia es igual a  $M_r = 0.831M_s$  [32]. Los valores de  $M_r/M_s$  para las tres muestras

estequiométricas de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , sintetizadas a diferente temperatura se resumen en la Tabla 7. Los valores de  $(M_r/M_s)$  próximos a  $\approx 0.60$  a 5 K que se obtienen para todas las muestras estequiométricas indican que las NPs presentan anisotropía uniaxial, de acuerdo con el modelo de Stoner–Wohlfarth. Este valor a baja temperatura es notablemente mayor que a 298 K, debido a que las agitaciones térmicas a temperatura ambiente rompen el ordenamiento magnético dejando una menor remanencia a  $H = 0$  T comparado con los datos a 5 K. A 298 K el valor obtenido de  $M_r/M_s = 0.2$  para las nanopartículas más pequeñas, este valor bajo comparado con el de las otras dos muestras, debido a que este tamaño se encuentra muy próximo al  $D_{sp} \approx 10$  nm que se ha estimado con anterioridad. La relación  $M_r/M_s$  aumenta con el tamaño de partícula a 298 K y alcanza su mayor valor en 0.3, Tabla 7.

### 4.3 Propiedades Coloidales de la Ferrita de Cobalto tras la Síntesis Electroquímica.

Como se ha descrito en el capítulo 4.2, el tamaño de la nanopartícula afecta enormemente a su comportamiento magnético debido especialmente a la dependencia de este con la relación superficie/volumen [33]. Entender estos comportamientos es de vital importancia a la hora de desarrollar NPs magnéticas para aplicaciones biomédicas tales como hipertermia y RMI [33-36].

Para valorar la capacidad que presentan las nanopartículas para generar calor cuando se les aplica un campo magnético alterno (base de los tratamientos médicos mediante hipertermia) es imprescindible partir de un coloide estable en medio acuoso biocompatible y que no se agregue bajo la acción del campo magnético externo [37]. Para cuantificar la viabilidad de las nanopartículas electrosintetizadas se ha estudiado el estado de agregación de las muestras estequiométricas tras su síntesis con el surfactante bromuro de tetrabutil amonio, para lo cual se midió el potencial Z con electrolito fondo  $1.10^{-2}$  M de  $\text{KNO}_3$  y el tamaño hidrodinámico (TH) en medio acuoso (Tabla 8).

*Tabla 8. Potencial Z y tamaño hidrodinámico a pH 7 de las muestras estequiométricas, CoFe(50:80)mA-25°C, CoFe(50:90)mA-60°C y CoFe(50:100)mA-80 °C. Se compara con el tamaño de partícula determinado por TEM.*

Tª síntesis	Potencial Z (mV)	TH (nm)	D <sub>TEM</sub> (nm)
25°C	9.2±1.1	379±34	22±4
60°C	8.7±1.6	405±27	36±5
80°C	4.2±2.7	654±67	59±9

Los valores del tamaño hidrodinámico, son mayores que las medidas del tamaño de partícula determinada en la micrografía TEM, ya que mediante la técnica del DLS se mide el tamaño de la nanopartícula en el medio de dispersión, es decir, el tamaño del conjunto formado por la nanopartícula, el surfactante y la esfera de solvatación. Las tres muestras presentan tamaños hidrodinámicos con valores notablemente altos, que se incrementan al aumentar la temperatura de síntesis, ya que es superior el tamaño de partícula, y por tanto la superficie sobre la que pueden adsorberse las moléculas de disolvente. Además, al aumentar la temperatura de síntesis, aumentan las interacciones entre las nanopartículas debido a su tamaño, lo que unido a la posibilidad de que el surfactante empleado en el proceso de electrosíntesis no recubra las nanopartículas de una forma eficiente favorece la agregación y hace que aumente el tamaño en medio acuoso. Por otro lado el potencial Z, que refleja la estabilidad del coloide, presenta valores muy alejados del valor óptimo, que se asume de  $\pm 30$  mV [38].

Se puede concluir pues, que el surfactante utilizado durante el proceso de síntesis (bromuro de tetrabutil amonio) es efectivo en cuanto a aportar la conductividad necesaria al sistema para que tengan lugar los procesos redox, pero no es un buen surfactante, no recubre bien ni estabiliza adecuadamente las nanopartículas y por tanto éstas se agregan en medio acuoso y finalmente precipitan. Por este motivo, una vez sintetizado el producto deseado se añadió al proceso una nueva etapa, la de intercambio del surfactante por otro que permita la obtención de un coloide más estable.

#### 4.4 Intercambio de Surfactante: Estabilización con AC

Se llevó a cabo el intercambio del bromuro de tetrabutil amonio por ácido cítrico como se describe en el capítulo 3, sección 3.2.1, página 67. El procedimiento se realizó exclusivamente con las muestras estequiométricas sintetizadas a 25 y 60 °C ya que como se ha indicado en la sección 4.1.2, con la síntesis a 80 °C se obtienen NPs estequiométricas pero muy polidispersas, con valores de diámetro de partícula incluso superiores al  $D_c$ .

Los valores de potencial Z en función del pH medido para el coloide en medio acuoso ( $\text{KNO}_3$   $10^{-2}\text{M}$ ) de las nanopartículas  $\text{CoFe}(50:80)\text{mA}-25^\circ\text{C}-\text{AC}$  y  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}-\text{AC}$  (nótese que al nombre de las muestras se le ha añadido la terminación - AC) estabilizadas con ácido cítrico se muestran en la Figura 27.

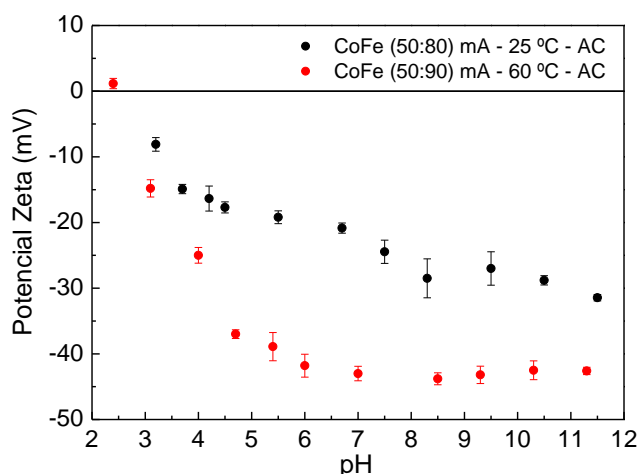


Figura 27. Potencial Z de las ferritas de cobalto estequiométricas  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}-\text{AC}$  y  $\text{CoFe}(50:80)\text{mA}-25^\circ\text{C}-\text{AC}$ , recubiertas con ácido cítrico.

Las medidas del tamaño hidrodinámico obtenidas de estos coloides fueron  $62 \pm 8$  nm para la muestra  $\text{CoFe}(50:80)\text{mA}-25^\circ\text{C}-\text{AC}$  y  $184 \pm 14$  nm para la muestra  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}-\text{AC}$ . Comparando estos valores con los mostrados en la Tabla 8, (recubrimiento con bromuro de tetrabutil amonio) se aprecia la clara disminución de la agregación de las nanopartículas con el proceso de recubrimiento en cítrico, alcanzando valores de tamaño hidrodinámico dos y hasta tres veces inferiores a los obtenidos tras la síntesis inicial. La disminución de la agregación está relacionada con un significativo aumento del potencial Z, Figura 27. Con el recubrimiento con ácido cítrico se obtienen a pH superior a 2, valores negativos de potencial Z, lo suficientemente elevados

para considerar estos coloides como estables. El valor de potencial Z a pH fisiológico de la muestra CoFe(50:80)mA-25°C-AC fue de  $\approx -20$  mV.

La unión del ácido cítrico a la superficie de las NPs se ha comprobado mediante espectroscopia de infrarrojo. La Figura 28, muestra el espectro de infrarrojo del AC (negro), de la muestra sintetizada a 25 °C con el surfactante inicial (verde) y las muestras sintetizadas a 25 y 60 °C una vez producido el intercambio de surfactante.

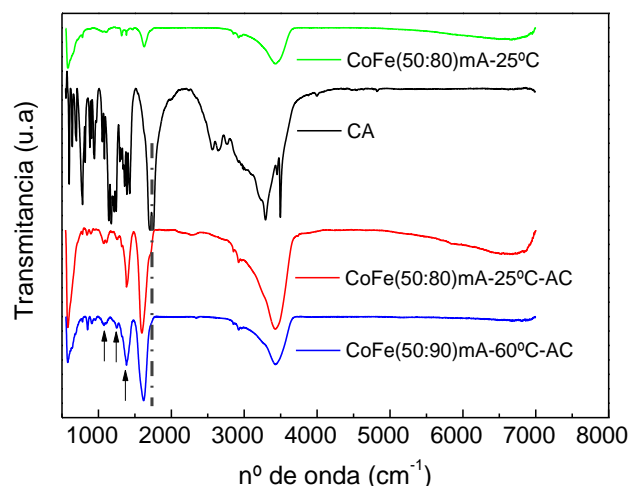


Figura 28. Espectro de infrarrojos de las muestras CoFe(50:80)mA-25°C (verde - surfactante tetrabutil amonio, rojo - ácido cítrico), de la muestra CoFe(50:90)mA-60°C-AC (azul) y del AC puro (negro).

Las bandas de absorción del AC puro muestran picos característicos a  $1708\text{ cm}^{-1}$  asignables a la vibración del grupo carbonilo C=O (tensión asimétrica) de los carboxilos (marcado con línea punteada). Este pico se desplaza a menor frecuencia cuando los grupos carboxilo se encuentran unidos a la superficie de la NP por quimisorción dándole carácter de enlace sencillo al grupo carbonilo [39]. Además, los modos vibracionales que aparecen en  $1388$ ,  $1250$  y  $1065\text{ cm}^{-1}$  en las muestras con AC corresponden a la tensión simétrica de COO, tensión simétrica de C-O, y grupos OH del AC [40]. La gran banda de IR que aparece a  $575\text{ cm}^{-1}$  se asocia al Fe-O modo de tensión simétrica vibracional del esqueleto de la ferrita de cobalto [41].

Los análisis de alta resolución realizados en un microscopio de transmisión de aberración corregida ( $C_s$ ) Titan Fei 60-300, operando a  $300\text{ keV}$ , de las muestras estequiométricas estabilizadas con ácido cítrico muestran un aspecto esponjoso, como se puede apreciar en la Figura 29 (muestra CoFe(50:80)mA-25°C-AC) y Figura 30 (muestra CoFe(50:90)mA-60°C-AC).



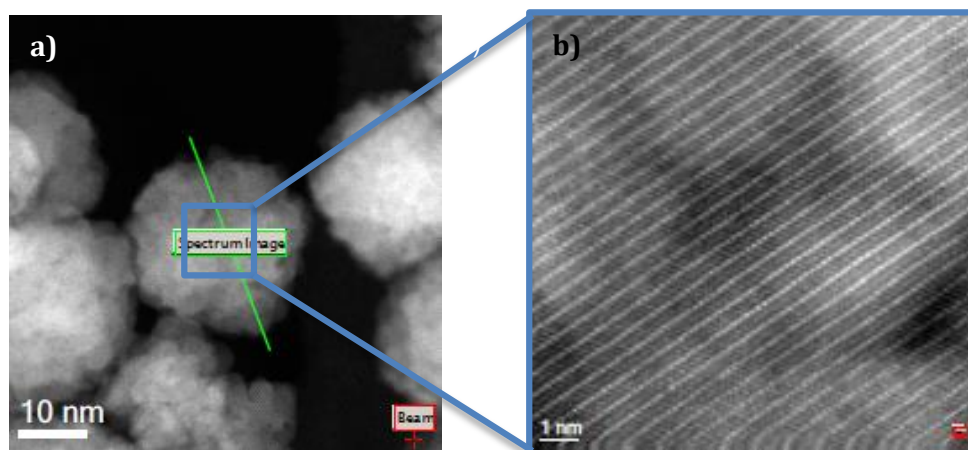


Figura 29. Micrografías de Cs corregidas STEM-HAADF de la muestra  $\text{CoFe}(50:80)\text{m}-25^\circ\text{C}-\text{AC}$ . a) conjunto de NPs de aproximadamente 20 nm. b) resolución atómica de una NP donde se observan los planos (111).

En la micrografía de la Figura 29b, se muestran la orientación del cristal a lo largo de la dirección (111). La orientación de los planos cristalinos indica la formación de partículas monodominio, la formación de un único cristal, al menos en el rango de imagen expuesto.

Adicionalmente, se extrajeron perfiles de composición química a partir de los espectros STEM-EELS realizados sobre la diagonal de dos nanopartículas con tamaño de 38 nm, como muestra la Figura 30a. En la Figura 30b, se presenta el perfil de composición de las NPs a lo largo de la diagonal analizada, en la que se han atribuido los colores azul, rojo y verde al oxígeno, hierro y cobalto respectivamente. Se aprecia como la composición de los elementos que constituyen las NPs es homogénea a lo largo de la diagonal ensayada y coinciden espacialmente, lo que demuestra por tanto la formación de la ferrita de cobalto.

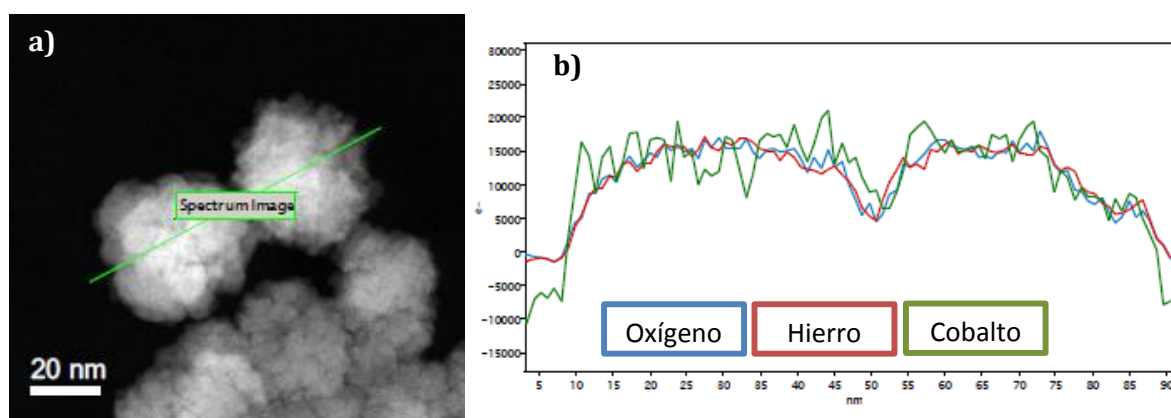


Figura 30. Micrografías de Cs corregidas STEM-HAADF. a) conjunto de NPs de aproximadamente 38 nm. b) perfil de composición química de las nanopartículas de  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}-\text{AC}$ .

## 4.5 Estructura Magnética y Cristalográfica de las NPs de $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .

Se realizaron ensayos de TXRF para analizar la relación molar de Fe y Co tras el proceso de estabilización en ácido cítrico de las muestras  $\text{CoFe}(50:80)\text{mA}-25^\circ\text{C}-\text{AC}$  y  $\text{CoFe}(50:90)\text{mA}-60^\circ\text{C}-\text{AC}$  y se comprobó que el proceso de intercambio de surfactante no afecta a esta proporción ya que en todos los casos se mantuvo el valor inicial de 2.0. Otro beneficio obtenido gracias a este proceso, es una menor polidispersidad en el tamaño de nanopartículas, como se observa en la micrografía de TEM de la muestra estequiométrica sintetizada a  $25^\circ\text{C}$ , cuyo tamaño medio antes del intercambio de surfactante era  $22 \pm 4$  nm, Figura 21, y después del intercambio  $18 \pm 3$  nm, Figura 31.

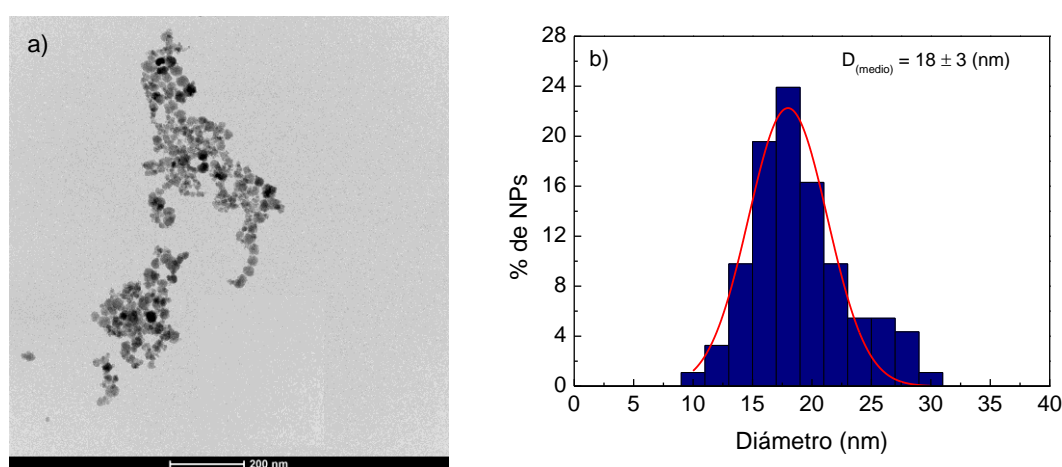


Figura 31. a) Micrografía electrónica de transmisión a 100x. b) Representación de la dispersión de tamaños calculado por TEM. Ambas de la muestra  $\text{CoFe}(50:80)\text{mA}-25^\circ\text{C}$  estabilizada en AC.

Después del intercambio las nanopartículas se dispersan más debido a la buena acción del recubrimiento, por lo que es posible medir los tamaños con mayor precisión. El proceso de estabilización en cítrico va a reducir también el tamaño de cristal determinado gracias al ajuste del difractograma por el método Rietveld, obteniéndose un valor de  $11.5$  (4) nm, debido a la obtención de cristales individuales y no agregados. El valor de las tensiones de red fue de  $0.42$  (1) nm y el parámetro de red de  $8.402$ (1) Å.

El pH de 5.2 utilizado para lograr el recubrimiento con cítrico junto con la temperatura de  $80^\circ\text{C}$ , puede disolver las NPs de mayor tamaño y por tanto aumentar la fracción de las NPs pequeñas [42]. Una ventaja adicional del proceso de intercambio de surfactante es que se hace innecesario el tratamiento de lavado de la muestra descrito previamente: lavado con agua, centrifugado y separación magnética para obtener la muestra estequiométrica sin impurezas.

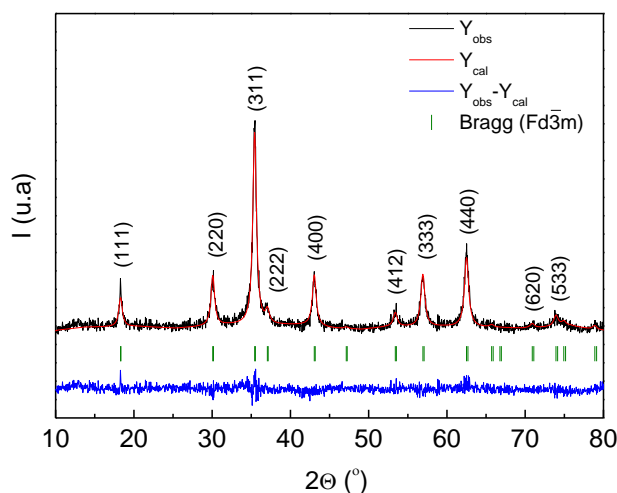
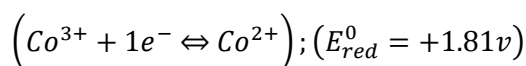


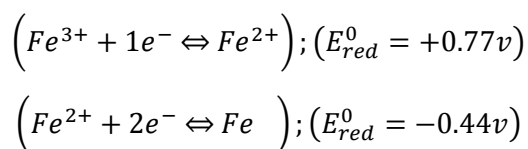
Figura 32. Refinamiento Rietveld del difractograma de rayos X de la muestra (CoFe-25°C-AC). (I) posiciones de Bragg de la estructura  $Fd\bar{3}m$ . ( $R_{Bragg} = 11.7$ ,  $R_f = 7.19$ ).

Una vez establecido el protocolo para sintetizar NPs de ferritas de cobalto estequiométricas, sin impurezas y con dispersión de tamaño de NP menor gracias al recubrimiento con ácido cítrico, se caracterizó la estructura magnética y cristalina de las nanopartículas, secadas a partir del coloide con cítrico, mediante técnicas de caracterización complementarias, como son XANES, DN y espectroscopia Mössbauer. Para hacer más sencilla la nomenclatura a partir de este momento las muestras anteriormente nombradas CoFe(50:80)mA-25°C-AC y CoFe(50:90)mA-60°C-AC se llamarán CoFe-25°C-AC y CoFe-60°C-AC. El estudio más exhaustivo se ha centrado en la muestra CoFe-25°C-AC, cuyo difractograma de rayos X ya se ha mostrado en la Figura 32.

La caracterización estructural de las muestras electrosintetizadas hasta el momento, se ha realizado partiendo de la suposición de que la ferrita de cobalto contenía en su estructura exclusivamente los iones que teóricamente la constituyen,  $Fe^{3+}$  y  $Co^{2+}$  y con esta suposición se ha procedido a refinar los difractogramas de rayos X por el método de Rietveld y a ajustar los espectros de Mössbauer. En cambio, es posible que la oxidación de las láminas de cobalto en el proceso de electrosíntesis pueda producir la oxidación a  $Co^{3+}$  o incluso  $Co^{4+}$ .



y el Fe podría presentarse en forma de  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$  o mezcla de ambos, si bien no se observa por espectroscopia Mössbauer.



Para comprobar que la estructura de la ferrita solo la conforman el  $Fe^{3+}$  y el  $Co^{2+}$  se ha recurrido a la absorción de Rayos X.

#### 4.5.1 Absorción de rayos X (XANES)

El análisis de la región XANES del espectro de absorción de rayos X, aporta información del estado de oxidación del átomo absorbente y de la simetría de su entorno. En concreto, para los átomos de Fe y Co, el estado de oxidación puede determinarse con precisión al comparar la posición del borde de absorción más intenso con el de patrones de referencia, medidos en las mismas condiciones. La posición del borde de absorción puede determinarse con una certeza de  $\pm 0.5$  eV, y típicamente, su posición aumenta  $\sim 3$  eV cuando el estado de oxidación aumenta de +2 a +3 [43, 44]. Se han empleado como patrones los espectros del borde de absorción de: lámina de Fe, FeO,  $Fe_3O_4$  y  $\alpha$ - $Fe_2O_3$  para el Fe y lámina de Co,  $Co_3O_4$  y CoO para el Co.

En la Figura 33, se muestra el espectro XANES normalizado de la muestra CoFe-25°C-AC en el borde K del cobalto.

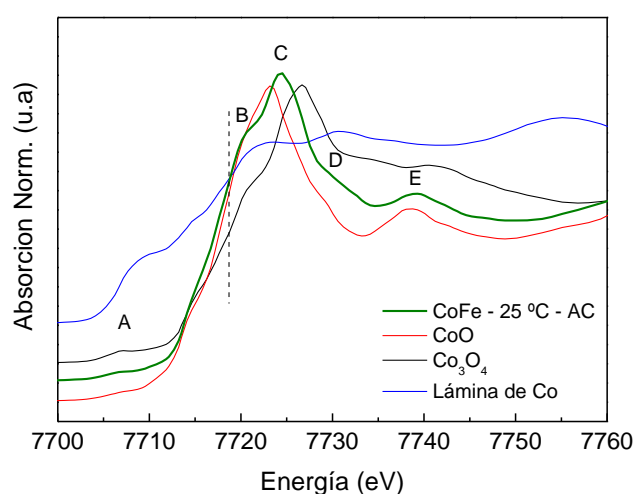


Figura 33. Espectro XANES en el borde K del Co de la muestra CoFe-25 °C-AC comparado con compuestos de cobalto comerciales.

A modo de comparativa, también se han incluido los espectros XANES de muestras de referencia en las que el cobalto presenta diferentes estados de oxidación; lámina de Co(0), CoO (+2) y Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (+2, +3). Los espectros XANES del borde K del Co para la ferrita CoFe-25°C-AC se pueden descomponer en cuatro máximos B, C, D y E situados a 7719, 7724, 7730 y 7740 eV que están de acuerdo con los valores recogidos para óxidos de Co<sup>2+</sup>, y un máximo A en el preborde situado a 7707 eV [45, 46].

Como se puede apreciar en la Figura 33, el espectro de absorción en el borde K del Co en la ferrita presenta un incremento en la absorción aproximadamente desde 7710 eV con un hombro en 7720 eV y un máximo en 7724 eV. El espectro para la lámina de cobalto muestra un perfil netamente diferente, sin un máximo definido (“white line”) y con un hombro en 7707 eV. El Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> que presenta estados de oxidación Co<sup>2+</sup> y Co<sup>3+</sup>, tiene la “white line” típica de los óxidos, pero con el máximo a mayor energía que nuestra muestra (7726 eV), en cambio la pendiente por debajo de la máxima absorción es menor comparada con la muestra. Finalmente, el perfil del CoO con estado de oxidación Co<sup>2+</sup>, es muy similar a la muestra de ferrita de cobalto, con un máximo de absorción de 7718 eV. De estos resultados se puede concluir, que el cobalto se encuentra en un estado de oxidación Co<sup>2+</sup> en la estructura de la ferrita de cobalto CoFe-25°C-AC.

El preborde del borde K del Fe y del borde K del Co aporta información de la simetría octaédrica y/o tetraédrica de la estructura espinela. Siendo más estrecha e intensa para las posiciones tetraédricas y más ancha y menos intensa para los sitios octaédricos. Esto es debido principalmente a que la simetría tetraédrica es no centrosimétrica y esto permite las transiciones p, f y d que contribuyen al pico del preborde [47]. Cuando ambas posiciones se encuentran ocupadas, el pico del preborde será la suma de ambas contribuciones y aumentará en intensidad directamente con la proporción de los sitios tetraédricos [47]. La posición del máximo del preborde incrementa ligeramente ~ 0.3 eV desde la ocupación total de sitios en tetraédrica a sitios octaédricos, este desplazamiento es pequeño comparado con el de ~1.5 eV que sufre el preborde cuando la oxidación aumenta de (+2) a (+3)[47].

El preborde del Co se ha comparado con patrones comerciales Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> donde el Co<sup>2+</sup> se encuentra en Td y en Oh, y con CoO donde el Co<sup>2+</sup> se encuentra exclusivamente en sitios Oh, si bien hay que tener en cuenta que a tan baja intensidad no es fácil analizar esta región, Figura 34. Los tres compuestos presentan un máximo (A) en torno a 7707 eV. La baja intensidad de éste en la muestra CoFe-25°C-AC comparado con la intensidad de Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (con sitios Td y Oh), indica que el Co<sup>2+</sup> principalmente se encuentra situado en sitios Oh (elevada centrosimetría), con perfil más similar al patrón de CoO (Co<sup>2+</sup> en Oh) [48].

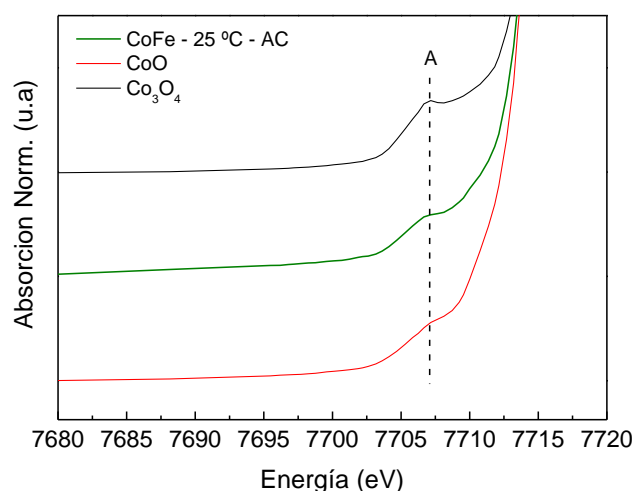


Figura 34. Pre borde del borde K del Co, comparando la muestra con dos patrones de referencia ( $\text{CoO}$ ) y ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ ).

En el caso del espectro XANES en el borde de K del Fe, se ha comparado la ferrita con compuestos patrón también con diferentes estados de oxidación de hierro: lámina de hierro (0),  $\text{FeO} (+2)$ ,  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3 (+3)$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4 (+2, +3)$ , Figura 35.

En el caso del espectro XANES en el borde del K del Fe, Figura 35, la muestra presenta un máximo (F) en el preborde en torno a 7110 eV seguido de un rápido incremento en la absorción, tras el cual aparecen los máximos G, H e I con energía 7129, 7136 y 7143 eV respectivamente y una energía de enlace de 7122 eV. La lámina de Fe presenta un perfil diferente y tiene una energía de enlace de 7119 eV mientras que la energía de enlace en la magnetita es de 7120 eV.

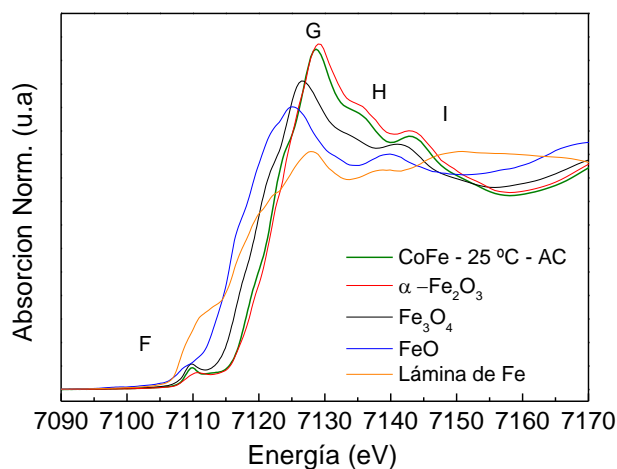


Figura 35. Espectro XANES en el borde K del Fe de la muestra  $\text{CoFe-25}^\circ\text{C-AC}$ , comparada con muestras comerciales que contienen hierro en su estructura.

Como se puede observar, el  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  presenta un espectro muy similar al de la muestra, con los máximos G, H e I comunes y con la misma energía de enlace de 7122 eV. Esto significa que los cationes de Fe en la ferrita de cobalto tienen estado de oxidación +3, como el catión de hierro en la hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ).

La Figura 36, muestra el preborde del borde K del Fe en la ferrita, comparándolo con el del FeO con sitios Oh, ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . La diferencia en energías del pico del preborde cuando el estado de oxidación del Fe es +2 o +3 es aproximadamente  $\approx 1.5$  eV, como demuestran los picos de absorción del FeO (+2) y  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (+3). En cambio cuando se tienen estructuras con estados de oxidación (+2, +3), como es el caso de la ferrita de cobalto y de la magnetita, se obtienen energías en el preborde intermedias. En cuanto a los sitios ocupados por el  $\text{Fe}^{3+}$  en la ferrita de cobalto comparado con FeO y  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  con sitios Oh y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con sitios Oh y Td, es evidente la similitud en el máximo de absorción de las ferrita de cobalto y de la magnetita, ambos con sitios A y B en su estructura.

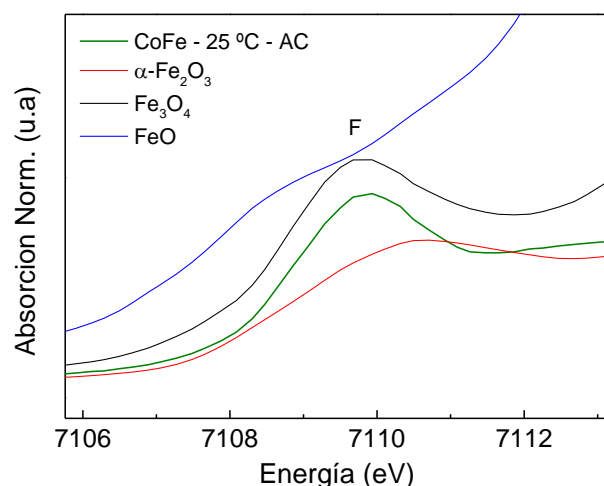


Figura 36. Preborde del borde K del Fe, comparando el preborde de la muestra CoFe- 25°C-AC con tres patrones de referencia (FeO), ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

Una vez confirmado mediante XANES el estado de oxidación de los metales en la ferrita, y la exclusiva presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  dentro de la red, se ha procedido a realizar un estudio más exhaustivo de su estructura mediante espectroscopia Mössbauer. La caracterización estructural de las muestras electrosintetizadas descrita en secciones previas, permite determinar el grupo espacial en el que cristalizan, su parámetro de red y el tamaño de partícula, sin embargo no es posible determinar con precisión mediante difracción de rayos X cual es la distribución de cationes en la red, debido a que los factores de *scattering* de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  son muy similares por tener ambos iones el mismo número de

electrones. Por este motivo se ha hecho un estudio mediante espectroscopia Mössbauer, técnica muy sensible al entorno del átomo sonda,  $^{57}\text{Fe}$ , y que por tanto permite obtener información directa sobre la distribución del hierro en posición tetraédrica y octaédrica, así como sobre su estado de oxidación, y en consecuencia, en combinación con otras técnicas, sobre la distribución del cobalto. No obstante, hay que tener en consideración que, como se ha mencionado con anterioridad, los parámetros hiperfinos del  $\text{Fe}^{3+}$  en ambas posiciones de la espinela no son muy diferentes, por lo que los subespectros en general solapan, y que en el caso de materiales de tamaño nanométrico se produce una cierta distribución de estos parámetros, lo que dificulta la correcta asignación. En los espectros de Mössbauer ajustados en secciones previas se ha relacionado el sextete de mayor campo magnético hiperfino y mayor desplazamiento isomérico con la posición octaédrica y el de menor campo y menor desplazamiento con la tetraédrica [9], pero para realizar un análisis más correcto se realizaron medidas de espectroscopia Mössbauer aplicando un campo magnético externo lo que permite alcanzar una mayor resolución y obtener el porcentaje de inversión de la estructura con mayor precisión. Mediante la espectroscopia Mössbauer también se ha determinado la temperatura de orden del material.

#### 4.5.2 Espectroscopia Mössbauer

Se ha llevado a cabo el estudio Mössbauer de la muestra  $\text{CoFe-25}^\circ\text{C-AC}$ , con temperatura variable desde 4.2 K hasta la región paramagnética. En la Figura 37, donde se muestran algunos espectros representativos, se observa como sólo a temperatura suficientemente baja los parámetros Mössbauer del Fe en la posición A y B de la estructura difieren lo suficiente como para que se resuelvan en energía los dos subespectros. Los parámetros correspondientes a los espectros mostrados en la Figura 37, se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros obtenidos del ajuste de los espectros Mössbauer para las diferentes temperaturas de medida de la muestra  $\text{CoFe-25}^\circ\text{C-AC}$ .

T (K)	$\delta^*(\text{mm/s})$		$H_{\text{hf}}(\text{T}) \pm 0.2$		Area (%) $\pm 1$	
	$\text{Fe}^{3+}_{\text{A}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{B}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{A}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{B}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{A}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{B}}$
875	-0.153(1)	0.107(1)	0	0	37	63
825	0.024(2)	0.112(2)	21.1	11.0	36 <sub>fijo</sub>	64 <sub>fijo</sub>
775	0.051(2)	0.166(2)	30.1	26.2	74	26
300	0.29(5)	0.51 (5)	48.6	50.9	75	25
100	0.378(2)	0.504(2)	50.9	54.2	60	40
4.2	0.388(1)	0.512(1)	51.1	54.4	55	44

\*El desplazamiento isomérico ( $\delta$ ) es relativo al baricentro del espectro de una lámina de  $\alpha\text{-Fe}$  de  $6\mu\text{m}$ .



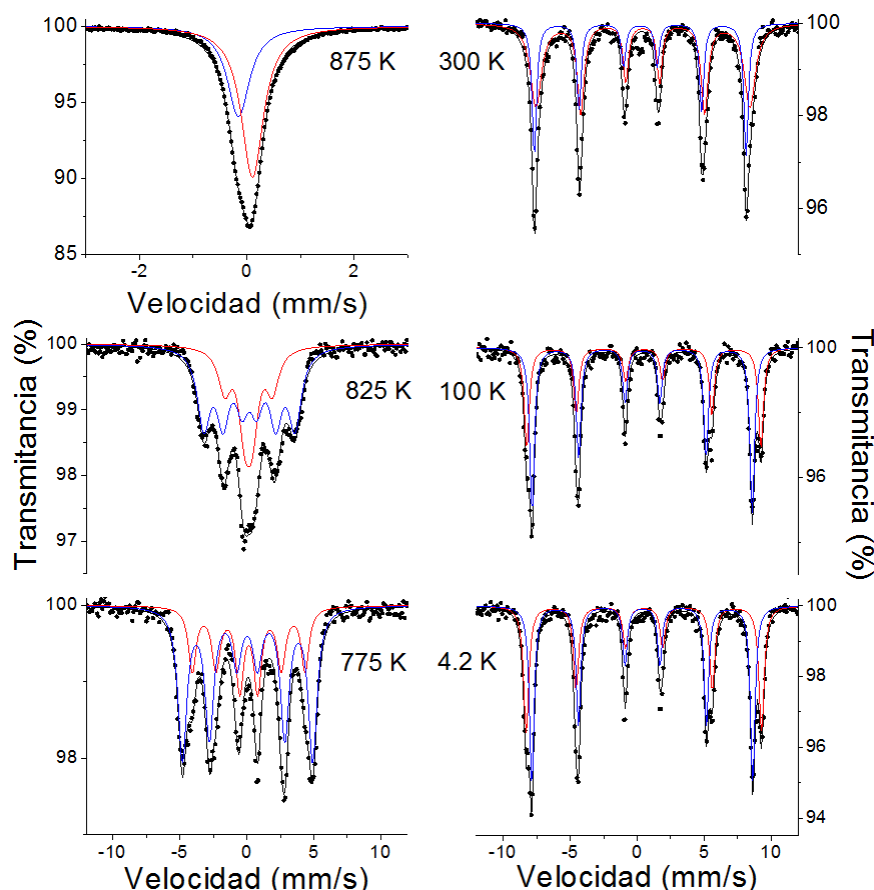


Figura 37. Espectros Mössbauer de la muestra CoFe-25°C-AC a temperatura variable, desde la región paramagnética (875 K) hasta 4.2 K.

A temperaturas inferiores a la de la transición magnética, los espectros se interpretan como la suma de dos sextetes, cuyo campo magnético hiperfino ( $H_{hf}$ ) aumenta a medida que se enfría la muestra hasta alcanzar prácticamente la saturación, con valores de  $H_{hf}$  54,4(1) y 51,1(1) T a 4.2 K. Estos sextetes pueden ser asignados al Fe en la posición octaédrica y tetraédrica de la espinela, respectivamente. En general, a temperaturas lo suficientemente por debajo de  $T_0$  los valores de  $H_{hf}$  y  $\delta$  para el  $Fe^{3+}$  octaédrico son mayores que los del tetraédrico debido al mayor carácter covalente del enlace  $Fe^{3+}_A-O^{2-}$  que el del  $Fe^{3+}_B-O^{2-}$ . Como consecuencia, la densidad de electrones en el núcleo del  $Fe^{3+}_A$  es mayor, y por consiguiente menor su desplazamiento isomérico. Por otra parte, el aumento de la covalencia para el  $Fe^{3+}$  de alto spin produce una reducción del campo hiperfino resultante, debido a una contribución positiva a la interacción de contacto de Fermi [49, 50].

Por encima de  $T_0$  el espectro se interpreta como la convolución de dos picos de absorción, correspondientes al  $Fe^{3+}$ , en los dos entornos cúbicos diferentes, y si se asume que el factor Lamb-Mössbauer es el mismo para el  $^{57}Fe$  en ambas posiciones, del área resonante de cada subespectro se

desprende que el 37% del Fe estaría en la posición tetraédrica y que el 63% ocuparía la posición octaédrica. Sin embargo, si se analiza el % de  $\text{Fe}^{3+}$  reflejado en la Tabla 9 a diferentes temperaturas, se observa que este % no es constante, y aunque se puede asumir la migración de cationes a alta temperatura, se ha trabajado siempre muy por debajo de la temperatura de fusión de 1843 K [51], por lo que se desprende que la asunción de que del área resonante en cada uno de los subespectros nos proporciona directamente la distribución catiónica del  $\text{Fe}^{3+}$  en la red cristalina en este caso no es correcta, tal como ya recoge la bibliografía debido al solapamiento de los subespectros. En general las anchuras de las líneas resonantes del sextete de  $\text{Fe}_B^{3+}$  son mayores, ya que este es el resultado de la superposición de tres o más sextetes, no resueltos en energía, cuyo origen está en las diferentes combinaciones de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  situados en la posición A de la estructura, y que tendrían los cationes de la posición B como vecinos. La consecuencia de este ensanchamiento de líneas, es que en general y como se verá a continuación, la cantidad de  $\text{Fe}_B^{3+}$  está subestimada.

En la Figura 38 se muestra la evolución del campo magnético hiperfino de cada una de las subredes con la temperatura, y su ajuste a la expresión (4.5).

$$H(t) = B H_0 t_{red}^{\beta} [1 + A t_{red}^{\Delta} + O t_{red}^{2\Delta}] \quad (4.5)$$

dónde  $t_{red}$  es la temperatura reducida del sistema ( $t_{red} = 1 - T/T_0$ ),  $\beta$  el exponente crítico de la transición de fase para-ferrimagnética,  $\Delta$  el exponente de corrección de escala de la transición,  $H_0$  el valor del campo a 0 K y B, A y O parámetros a ajustar.

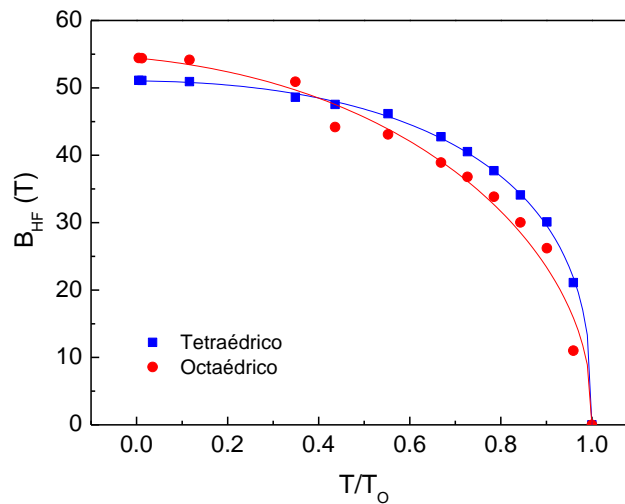


Figura 38. Evolución del campo magnético hiperfino de cada una de las subredes con  $T$ .

Para parametrizar la evolución del campo hiperfino se han tomado los valores teóricos de los parámetros críticos para una transición magnética de 2º orden, de tipo Heisenberg ( $d=3$ ,  $n=3$ )

$\beta=0,365$  y  $\Delta=0,550$  [52], obteniéndose 860 K como temperatura de orden del material, valor muy próximo a otros anteriormente publicados para ferritas de inversión y tamaño semejantes. Franco et al. determinaron un valor de  $T_0 = 830$  K mediante las curvas de dependencia de la magnetización con la temperatura en ferritas de cobalto de 40 nm [23], superiores a la temperatura de orden del *bulk* de 790 K [16]. El cruce en los valores de  $H_{hf}$  en las posiciones A y B, en  $T/T_0 \approx 0.4$ , no es frecuente, pero se ha observado con anterioridad en el  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  [53], y en otras ferritas como  $\text{MnF}_2\text{O}_4$  [54] y se relaciona con una distribución “casual” de cationes en la red y la fuerza de super-intercambio entre estos.

Para deshacer el solapamiento de los sextetes y poder determinar el grado de inversión de la espinela, se registraron espectros de la misma muestra aplicando un campo magnético externo ( $H_{ext}$ ) de 7 T, paralelo a la dirección de propagación de los rayos  $\gamma$ , Figura 39.

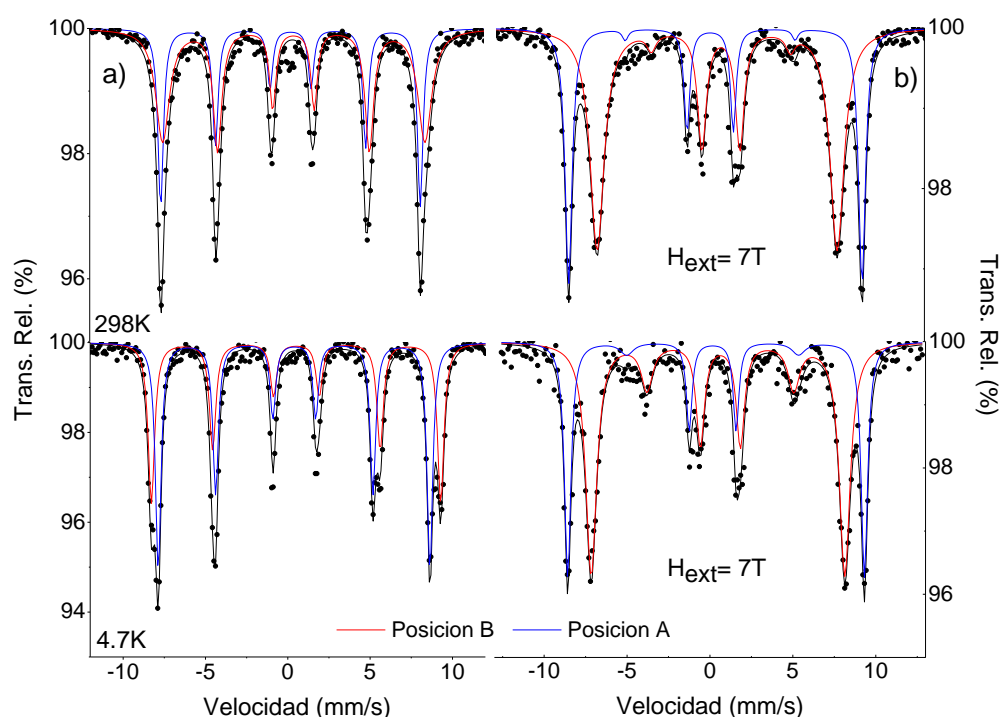


Figura 39. a) Espectros Mössbauer realizados sin campo a 298 K y 4.2 K y b) Espectros con campo magnético aplicado de 7 T paralelo a la radiación  $\gamma$  a 298 K y 4.2 K.

El  $H_{ext}$  tiende a alinear paralelamente los espines de la subred con mayor momento magnético, en este caso la octaédrica, de manera que la subred tetraédrica, que es colinear, se orienta antiparalelamente. Como el campo hiperfino que experimenta un núcleo de  $\text{Fe}^{3+}$ , en la ferrita es opuesto a su propio momento magnético al tener los primeros vecinos orientados

antiparalelamente, los núcleos de la posición octaédrica experimentan un campo efectivo inferior al hiperfino bajo la acción de un  $H_{\text{ext}}$  y los núcleos en posición tetraédrica un campo efectivo superior, lo que disminuye el solapamiento de ambos subespectros y permite un mejor ajuste del espectro (ver Figura 39). Por otra parte, al aplicar el  $H_{\text{ext}}$  paralelo a la dirección de la radiación  $\gamma$  generalmente se simplifica el análisis del espectro, ya que en el caso de absorbentes delgados, la relación de intensidades del sextete es 3:p:1:1:p:3, donde p viene dado por la ecuación (4.6).

$$p = \frac{4 \sin^2 \theta}{1 + \cos^2 \theta} \quad (4.6)$$

siendo  $\theta$  el ángulo entre la radiación incidente y el campo efectivo en cada una de las posiciones de la red, por lo que si la fuerza del campo es suficiente para alinear el momento magnético, las transiciones con  $\Delta m_i = 0$ , (correspondientes a las líneas 2 y 5 del sextete), desaparecen.

Como se observa en la Figura 39, un campo de 7 T no es suficiente como para vencer la fuerte anisotropía magnética del material, por lo que de la relación de áreas  $A_{2,5}/A_{1,6}$  es posible determinar el ángulo  $\theta$ . Este ángulo se puede también determinar a partir del valor del campo efectivo ( $H_{\text{ef}}$ ) que experimentan los núcleos, como el campo resultante de la suma vectorial del campo hiperfino y el campo aplicado, ecuación (4.7).

$$H_{\text{hf}}^2 = H_{\text{ef}}^2 + H_{\text{ext}}^2 - 2H_{\text{ef}}H_{\text{ext}} \cos \theta \quad (4.7)$$

En la Tabla 10, se muestran los parámetros de la muestra CoFe-25°C-AC obtenidos a partir del ajuste del espectro Mössbauer con  $H_{\text{ext}} = 7$  T paralelo a la radiación.

Tabla 10. Parámetros obtenidos del ajuste de los espectros Mössbauer con campo y diferentes temperaturas de la muestra CoFe-25°C-AC.

T (K)	$H_{\text{efectivo}}(\text{T}) \pm 0.2$		$H_{\text{hf}}(\text{T}) \pm 0.2$		Área (%) $\pm 1$		$\theta(^{\circ}) \pm 1$	
	$\text{Fe}^{3+}_{\text{A}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{B}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{A}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{B}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{A}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{B}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{A}}$	$\text{Fe}^{3+}_{\text{B}}$
<b>300</b>	55.3	55.3	48.5	52.0	36	64	13	15
<b>100</b>	56.6	56.6	49.9	54.8	34	66	14	26
<b>10</b>	54.2	48.9	48.1	54.0	36	64	27	34
<b>4.2</b>	55.4	47.4	49.0	53.5	36	64	23	31

Como se observa en la Tabla 10, al aplicar el  $H_{\text{ext}}$  y resolver en energía los subespectros de la ferrita, el % del área resonante correspondiente al  $\text{Fe}^{3+}$  en cada una de las posiciones se mantiene constante con la temperatura como cabía esperar, y en muy buen acuerdo con la distribución determinada en la región paramagnética (37%  $\text{Fe}_{\text{A}}$ /63%  $\text{Fe}_{\text{B}}$ ).

De la determinación de la relación de áreas ( $\alpha = \% \text{ área subespectro minoritario} / \% \text{ área subespectro mayoritario}$ ) junto con la consideración de la fórmula teórica de la ferrita de cobalto,  $(\uparrow \text{Co}_x\text{Fe}_{1-x})(\downarrow \text{Co}_{(1-x)}\text{Fe}_{1+x})\text{O}_4$ , es posible determinar las ocupaciones dentro de la estructura según la ecuación (4.8).

$$x = \frac{1 - \alpha}{1 + \alpha} \quad (4.8)$$

Así, tomando los valores del área de los sextetes correspondientes al espectro obtenido con campo externo a 4.2 K se obtiene la estequiometría del compuesto CoFe-25°C-AC como  $(\uparrow \text{Co}_{0.28}\text{Fe}_{0.72})(\downarrow \text{Co}_{0.72}\text{Fe}_{1.28})\text{O}_4$  y el grado de inversión de la estructura ( $\gamma$ ), equivalente a la ocupación del Co en posición octaédrica, que es igual a 0.72.

La estequiometría de la muestra CoFe-60°C-AC, con tamaño de partícula de 31.8 nm, determinado también por espectroscopia Mössbauer a 4.2 K y un campo aplicado de 7 T paralelo a la radiación, es de  $(\uparrow \text{Co}_{0.26}\text{Fe}_{0.74})(\downarrow \text{Co}_{0.74}\text{Fe}_{1.26})\text{O}_4$  y el grado de inversión 0.74. La diferencia en el grado de inversión de ambas muestras entra dentro del límite de la precisión de la medida, tal como cabía esperar, ya que el grado de inversión de las ferritas con estructura de espinela parcialmente inversa depende fundamentalmente del método de síntesis [25, 55] y de la historia térmica [53]. V Blanco-Gutiérrez y col. obtuvieron ordenes de inversión de 0.77 y 0.70 para muestras de ferrita de cobalto sintetizadas por el método solvotermal con tamaño de cristal de 100 y 15 nm respectivamente [24]. D Peddis y col.[25] obtuvieron un orden de inversión de 0.72 para ferritas de cobalto de 6 nm de diámetro sintetizadas por descomposición térmica.

En la estructura espinela cada  $\text{Fe}^{3+}(\text{A})$  se encuentra rodeado de 12 iones B, mientras que un  $\text{Fe}^{3+}(\text{B})$  tiene solo 6 vecinos A en sus proximidades. Partiendo de la estequiometría obtenida con el ajuste del espectro Mössbauer con campo, se puede asumir de forma general que cada  $\text{Fe}^{3+}(\text{B})$  tiene 2  $\text{Co}^{2+}(\text{A})$  y 4  $\text{Fe}^{3+}(\text{A})$ . En cambio, los  $\text{Fe}^{3+}(\text{A})$  se encuentran rodeados de 7  $\text{Fe}^{3+}(\text{B})$  y 5  $\text{Co}^{2+}(\text{B})$ . Por tanto, los átomos de Fe localizados en B se encuentran rodeados de un  $\sim 67\%$  de Fe en posición A, mientras que los átomos de Fe en A tiene aproximadamente  $\sim 59\%$  de Fe en B rodeándole. Por tanto, los átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  con simetría A o B sentirán una fuerza de super-intercambio similar, teniendo en cuenta que las interacciones  $J_{AB}$  son predominantes con respecto a  $J_{AA}$  y  $J_{BB}$  [31]. Gracias a este argumento se puede explicar cualitativamente porque se observa un canteo de spines en las dos posiciones, A y B (Tabla 10). Peddis y col. publicaron la existencia de espines canteados en una única posición de la ferrita de cobalto, atribuyendo este hecho a la inversión de la estructura, ya que en este caso el Fe en B se encontraba rodeado del  $\sim 16\%$  de Fe en A, y el Fe en A se encontraba rodeado del  $\sim 84\%$  de Fe en B. Por tanto los átomos de Fe situados en el hueco tetraédrico (A) sentían una

fuerza total de super-intercambio mucho mayor que la que sentían los Fe situados en B, que son los que sufren el spin canting [56]. Por el contrario, cuando estos mismos autores analizan una ferrita de cobalto, en la que el grado de inversión es 0.72, observan también el ángulo de canteo en ambas posiciones [25].

Teniendo en cuenta la estequiometría determinada a partir del espectro Mössbauer con campo aplicado a 4.2 K y los momentos teóricos del  $\text{Co}^{2+}$  ( $3\mu_B$ ) y del  $\text{Fe}^{3+}$  ( $5\mu_B$ ) [16], se puede calcular el momento magnético de cada subred para la muestra  $\text{CoFe-25}^\circ\text{C-AC}$  dando un valor de,  $M_A = 4.44 \mu_B$  y  $M_B = 4.28 \mu_B$ . El momento magnético total por fórmula unidad equivale a:

$$\mu_{f.u} = 2\mu_{B(\text{sitio B})} - \mu_{B(\text{sitio A})} = 2 * 4.28 - 4.44 = 4.12 \mu_B \quad (4.9)$$

Un valor más exacto se puede obtener si tomamos en consideración el ángulo de *canting* formado entre el campo aplicado y los momentos de los átomos de Fe (la contribución al *canting* de los átomos de Co es despreciable ya que su energía de anisotropía es muy elevada [57]). Para evaluar el efecto del canting en el momento magnético de las posiciones del Fe en A y en B se utiliza la ecuación (4.10), con lo que los valores que se obtienen a partir de los ángulos determinados por espectroscopia Mössbauer a 4.2 K (Tabla 10) son  $\mu_{B(\text{sitio B})} = 3.98$  y  $\mu_{B(\text{sitio A})} = 4.26$ , y por tanto el momento magnético total es  $M_T = 3.71 \mu_B$ .

$$M_{eff} = M_{atómico} \cdot \cos \theta \quad (4.10)$$

Para comparar este valor de magnetización con el obtenido a partir de los ciclos de histéresis, se utilizaron las curvas de primera imanación medidas a 100 K entre 0 y 50 kOe que se muestran en la Figura 40. La saturación de magnetización y la anisotropía magnetocristalina se han calculado a partir de dichas curvas, ajustando estos datos experimentales a la ley de aproximación de la saturación, ecuación (4.11)[25, 58], entre los valores de 2 y 5 T.

$$M(T) = M_s(T) \cdot \left(1 - \frac{a}{H} - \frac{b}{H^2}\right) \quad (4.11)$$

Tomando,  $b = \frac{8}{105} \cdot \frac{K^2}{M_s^2}$ . Del valor obtenido de  $b$  se despeja la constante de anisotropía ( $K$ ) que es de  $8,04 \cdot 10^5 \text{ J/m}^3$ , valor superior a la anisotropía de la ferrita *bulk* de  $2 \cdot 10^5 \text{ J/m}^3$  [16].

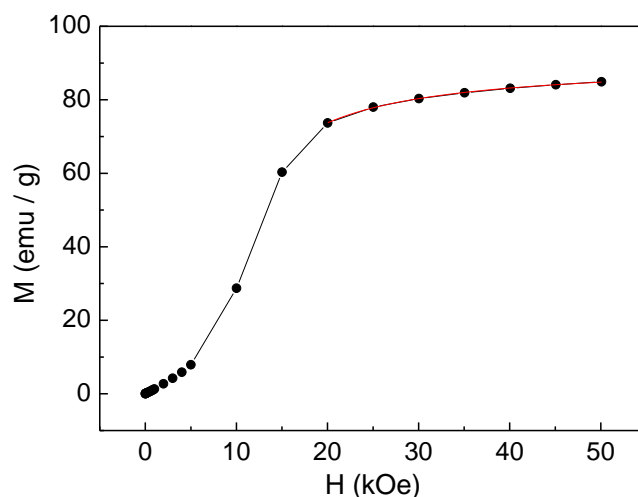


Figura 40. Curvas de primera imanación de la muestra CoFe-25°C-AC a 100 K. En rojo ajuste de la ecuación (4.11).

El valor de  $M_s$  obtenido mediante el ajuste de  $M$  vs  $H$  fue de 90.2(6) emu/g lo que equivaldría a 3.79  $\mu_B$  por fórmula unidad. La diferencia entre los  $\mu_B$  calculados a partir de las medidas Mössbauer a 100 K y los calculados con los ciclos de DC, 3.71  $\mu_B$  y 3.79  $\mu_B$  respectivamente, se encuentran dentro del error de la medida. Las discrepancias entre ambos valores se pueden atribuir a que el  $\text{Co}^{2+}$  puede presentar momento magnético orbital, que no se ha tenido en cuenta al calcular los momentos magnéticos teóricos. El aumento del momento magnético de la muestra CoFe-25°C-AC frente al del material másico (3.4 - 3.9  $\mu_B$ ) se asocia con la disminución del grado de inversión, que en el material másico es  $\gamma \approx 0.82$  [25].

### 4.5.3 Caracterización magnética - SQUID

Para completar la caracterización de la muestra CoFe-25°C-AC desde el punto de vista de sus propiedades magnéticas se han realizado medidas ZFC/FC. Las medidas ZFC/FC de la ferrita de cobalto con campos (0.1, 0.5, 1, 5, y 10 kOe) aplicados entre 5 y 400 K se muestran en la Figura 41. Todas las curvas presentan un comportamiento similar. El máximo en la curva ZFC con campo aplicado de 0.1 y 0.5 y 1 kOe no se observa en el rango de temperatura ensayado, estando por tanto situado a una temperatura superior a 400 K. Con los campos de 5 y 10 kOe se observa un máximo que está relacionado con el proceso de bloqueo o congelación de los momentos magnéticos de las nanopartículas. Por encima de esta temperatura, la energía de activación térmica ( $k_B T$ ) se sobrepone a la barrera de energía de anisotropía ( $E_a$ ) y la NP relaja desde el estado bloqueado al estado superparamagnético y su magnetización comienza a fluctuar aleatoriamente.

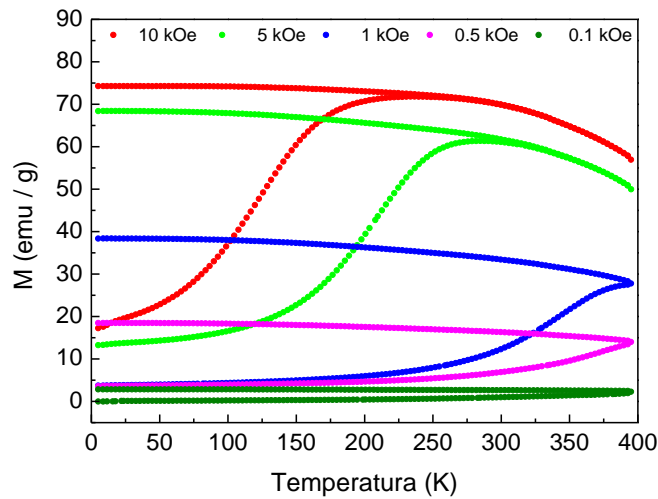


Figura 41. ZFC y FC de muestra CoFe-25°C-AC, medido bajo campos que varían desde 10 kOe hasta 0.1 kOe.

El valor de magnetización en las curvas FC muestra una clara independencia con la temperatura para temperaturas inferiores a la de bloqueo indicando la presencia de interacciones dipolares entre las partículas [57]. La temperatura de bloqueo decrece con el aumento de campo magnético aplicado. Tomando valores de 285 K para 5 kOe y 237 K para 10 kOe. Esta evolución está relacionada con una fuerte interacción de intercambio entre NPs lo que provoca una baja temperatura de orden.

Las curvas de primera imanación medidas a 100, 200 y 300 K entre 0 y 50 kOe se muestran en la Figura 42.

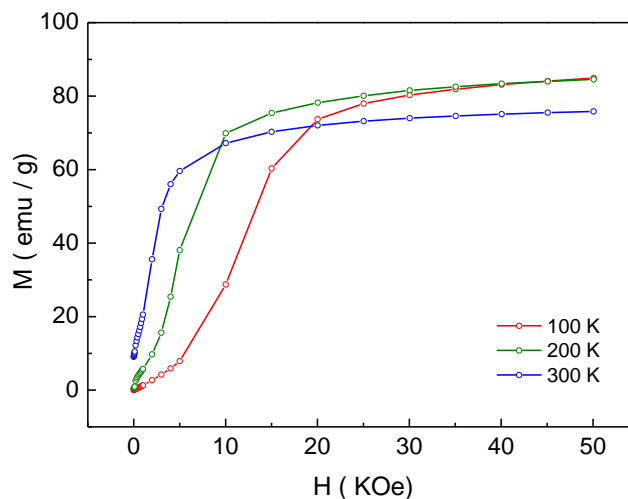


Figura 42. Curvas de primera imanación de la muestra CoFe-25°C-AC a 100, 200 y 300 K.



La saturación de magnetización y la anisotropía magnetocristalina se han calculado a partir de las curvas de primera imanación, ajustando estos datos experimentales a la ley de aproximación de la saturación, ecuación (4.11), entre los valores de 3 y 5 T, Tabla 11. Por otra parte, los valores de  $H_c$  y  $M_r$  recogidos en la Tabla 11, se han hallado a partir de los ciclos de histéresis (Figura 43). Finalmente los  $\mu_B$  se han calculado a partir de los valores de magnetización de saturación.

Tabla 11. Parámetros magnéticos de la muestra CoFe-25°C-AC.

T(K)	$M_s(\text{emu/g})$	$(\mu_B)$	$K \times 10^5 (\text{J/m}^3)$	$H_c (\text{Oe})$	$M_r (\text{emu/g})$
100	90.2(6)	3.79(12)	8.04(10)	7870	60.8
200	89.7(1)	3.77(2)	5.48(3)	3353	50.6
300	79.05(8)	3.32(6)	4.56(11)	1125	32.0

La anisotropía del CoFe-25°C-AC recogida en la Tabla 11, muestra una fuerte dependencia con la temperatura, reduciéndose el valor de anisotropía a 300 K prácticamente a la mitad con respecto al valor de  $K$  obtenido a 100 K. Esta fuerte dependencia de  $K$  con la temperatura se hace más notoria a temperaturas superiores a 300 K debido a la presencia de agitaciones térmicas que reducirán las interacciones entre las partículas[23]. La elevada anisotropía medida de manera general en ferritas de cobalto, es en gran parte debido a la presencia de iones  $\text{Co}^{2+}$  mayoritariamente en la posición B de la espinela [59]. En cambio las diferencias observadas entre la anisotropía de las nanopartículas y la del *bulk* se pueden atribuir a contribuciones adicionales del tipo anisotropía de superficie, o efectos relativos al tamaño. Los valores de los  $\mu_B$  están en coherencia con el orden de inversión determinado por espectroscopia Mössbauer. La relación entre la coercitividad y la temperatura de medida, se encuentra relacionada con la mayor dificultad para invertir los momentos cuando las agitaciones térmicas disminuyen, lo que provoca una mayor coercitividad.

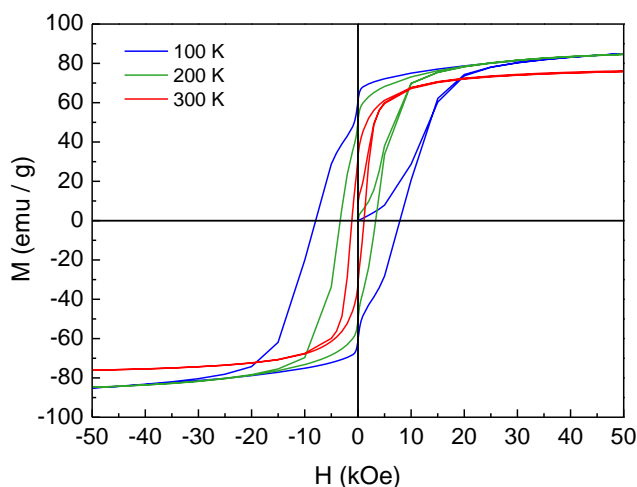


Figura 43. Ciclos de histéresis medidos a 100, 200 y 300 K de la muestra CoFe-25°C-AC hasta 5 kOe.

#### 4.5.4 Difracción de neutrones

La presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  y su ocupación dentro de la estructura de la ferrita como se ha mostrado en secciones previas, se ha determinado mediante absorción de rayos X y espectroscopia Mössbauer respectivamente. Para realizar los ajustes de Mössbauer se ha partido de la suposición de que la estructura no contenía vacantes de oxígeno. Para confirmar este hecho, y conocer la ocupación del oxígeno dentro de la red se ha recurrido a la difracción de neutrones (DN), ya que el factor de *scatering* de los oxígenos es mucho mayor en DN que en difracción de rayos X, además a partir del difractograma de neutrones es posible también refinar las posiciones y las ocupaciones de los cationes Fe y Co debido a que el factor de *scatering* de ambos también es diferente. Por otra parte, con esta técnica es posible resolver la estructura magnética del material, y obtener información de los momentos magnéticos de cada átomo. La temperatura de orden y el porcentaje de inversión de la estructura se pueden comparar con los datos calculados mediante espectroscopia Mössbauer.

Se realizaron medidas de difracción de neutrones desde temperatura ambiente hasta 800 K, registrando difractogramas cada 100 o 50 grados, observando como disminuyen las intensidades de los picos correspondientes a la estructura magnética. A 800 K las reflexiones obtenidas son debidas exclusivamente a la componente estructural del material. A partir de los difractogramas obtenidos y por medio del refinamiento por el método de Rietveld, se obtienen los parámetros cristalográficos. El difractograma de neutrones a 800 K de la muestra  $\text{CoFe-25}^\circ\text{C-AC}$  y el correspondiente refinamiento Rietveld se muestra en la Figura 44.

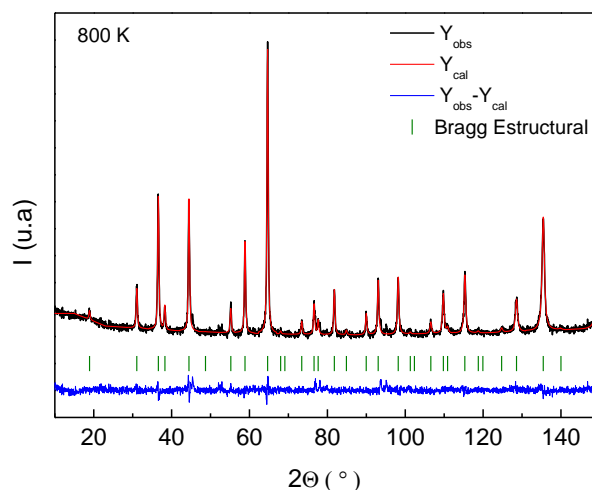


Figura 44. DN de la muestra  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  25 °C - AC medido a 800 K en el difractómetro D2B. ( / ) Posiciones de Bragg de la componente cristalina. Refinamiento de Rietveld de la estructura cristalina.  $R_{\text{Bragg}} = 5.8$  y  $R_f = 5.12$ .

El refinamiento se realizó fijando la relación molar de Fe respecto a Co en 2, (valor que se cuantificó previamente mediante TXRF) y fijando que las ocupaciones de la posición B son el doble que las de la posición A, tal y como define la estructura teórica de las ferritas ( $AB_2O_4$ ). Como punto de partida se supusieron ocupaciones completas de los cationes en la posición A y B y para el oxígeno. Estas ocupaciones iniciales se hallaron dividiendo la multiplicidad del sitio de cada uno de los átomos entre la multiplicidad general del grupo espacial ( $Fd\bar{3}m$ ). Por ejemplo el sitio del  $Co^{2+}$  en octaédrica es 16d y la multiplicidad del grupo espacial  $Fd\bar{3}m$  es 192, luego la ocupación completa del catión en (B) es de  $16/192 = 0.08333$ . Se realizó el cálculo correspondiente a cada átomo para calcular un valor inicial en cada posición y finalmente se dejó libertad en el ajuste para refinar todas las posiciones.

Las ocupaciones obtenidas gracias al refinamiento van a definir la estructura cristalina, y se pueden relacionar directamente con el grado de inversión y con la presencia o no de vacantes de oxígeno. Todos los parámetros refinados se resumen en la Tabla 12. Donde se muestran las ocupaciones tetraédricas (8a) y octaédricas (16d) del hierro y el cobalto, la ocupación del oxígeno (32e), posición del oxígeno dentro de la red, el parámetro de red, y el factor de temperatura isotrópico en A, B y oxígeno, todo ello a la temperatura de 800 K.

La diferencia en el factor de temperatura isotrópico de la posición A con respecto a la B es notable, como se observa en la Tabla 12. Este coeficiente se encuentra relacionado con la agitación o posible desorden que sufren los átomos en cada posición, siendo menor en el entorno tetraédrico que en el octaédrico.

Tabla 12. Resultados del refinamiento del DN tomado a 800 K de la muestra  $CoFe-25^\circ C-AC$ .

<b>T (800K)</b>	<b>Ajuste estructural</b>
Co1 (8a)	0.0114(4)
Fe1 (8a)	0.0303(2)
Fe2 (16d)	0.0531(2)
Co2 (16d)	0.0302(4)
O (32e)	0.1641(9)
O (x)	0.2555(2)
a(Å)	8.4475(8)
B <sub>iso</sub> O(Å <sup>2</sup> )	1.42(3)
B <sub>iso</sub> A(Å <sup>2</sup> )	0.84(6)
B <sub>iso</sub> B(Å <sup>2</sup> )	1.36(5)

A partir de las ocupaciones halladas se calcula un grado de inversión de la estructura  $\gamma = 0.72$ , por tanto la fórmula estequiométrica del compuesto será  $(Co_{0.27}Fe_{0.73})[Co_{0.36}Fe_{0.64}]_2O_4$ . Los

valores estructurales obtenidos a partir del refinamiento del difractograma de neutrones a 800K están en muy buen acuerdo con los obtenidos a partir de los espectros Mössbauer con campo magnético aplicado, o en la región paramagnética. Como ya se ha comentado, estos valores también están en acuerdo con los valores reportados en la bibliografía para la ferrita de cobalto en el rango de la nanoescala a partir de medidas de DN. Por ejemplo Peddis et al publicaron un orden de inversión del 74% para las ferritas de cobalto de 6 nm [25] medido a 300 K, mientras que Liu et al publicaron un valor del 69% con una dispersión de tamaños de entre 2 y 45 nm [60] medido también a 300 K, y un 66% de inversión para nanopartículas de ferrita de cobalto de 9.6 nm medido a 373 K [61].

La ocupación teórica de los oxígenos dentro de la red es  $32e/192 \approx 0.1667$  y el valor obtenido tras el ajuste del difractograma es de 0.1641(9), por tanto se puede concluir que la ferrita de cobalto analizada no presenta vacantes de oxígeno en su estructura. El parámetro de red obtenido por DN a 800 K es de 8.4475(8) Å, superior al calculado por difracción de rayos X a 298K, 8.402(1) Å, debido a la dilatación térmica provocada por el calentamiento del material.

Dado que no se espera una transformación estructural por debajo de la temperatura de orden, los parámetros cristalográficos obtenidos en este refinamiento a 800 K se utilizan para analizar los difractogramas obtenidos a menor temperatura, donde además de estructura cristalina se tiene la contribución de la difracción producida por la estructura magnética, Figura 45, si bien se reajustan los parámetros de red y el factor de temperatura isotrópico que si se van a ver afectados por la variación de temperatura.

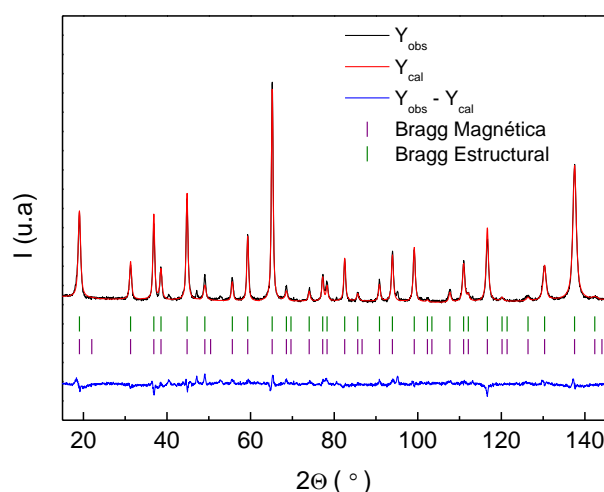


Figura 45. Refinamiento del difractograma de neutrones de la muestra CoFe-25°C-AC a 100 K registrado en la línea D2B.  $R_{\text{Bragg}} = 4.84 + (\text{magnético}) 9.57$ ,  $R_f = 4.25$ .

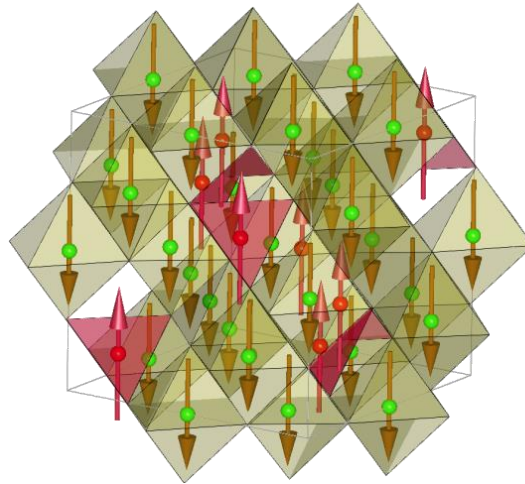
Para el refinamiento de la estructura magnética se utilizó un vector de propagación (0,0,0) típico de las estructuras ferromagnéticas. Esto quiere decir que la celda unidad magnética coincide con la celda unidad cristalina. Los momentos se encuentran alineados en la dirección  $b$  (0,1,0). En la Tabla 13 se muestran algunos de los parámetros refinados, como el parámetro de red y los factores de temperatura isotrópicos a 100 K. Para esta temperatura también se adjuntan los momentos magnéticos determinados para los sitios A y B ( $M_A$  y  $M_B$ ). Los momentos magnéticos de ambas posiciones se refieren al momento global de cada una de ellas, ya que no se puede refinar el valor del momento que cada catión ( $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ) tiene individualmente en cada posición (A y B). El momento magnético de la posición A es mayor que el de B. Esto es debido al entorno diferente de ambas posiciones con diferentes primeros vecinos y distancias, y por tanto diferentes valores de las integrales de intercambio de los iones de A y de B [62]. Golosovsky et al [63] publicaron para la maghemita que  $J_A > J_B$  por tanto, el momento en posición B presenta una interacción más débil que el de la A. Cuanto más pequeño es el enlace del espín en la posición B es más evidente que debe de existir más desorden debido a las rupturas de la simetría local y como consecuencia presenta menor momento magnético.

Tabla 13. Parámetros refinados en el ajuste experimental del difractograma de neutrones a 100 K medido en D2B.

T (100K)	Ajuste estructural	Ajuste magnético
Co1 (8a)	0.0114(4) - fijado	$M_A$ 4.04(8)
Fe1 (8a)	0.0303(2) - fijado	$M_B$ 3.25(6)
Fe2 (16d)	0.0531(2) - fijado	
Co2 (16d)	0.0302(4) - fijado	
O (32e)	0.1641(9) - fijado	
O (x)	0.2555(2) - fijado	
$a(\text{\AA})$	8.3847(7)	
$B_{\text{iso}} \text{ O}(\text{\AA}^2)$	0.63(3)	
$B_{\text{iso}} \text{ A}(\text{\AA}^2)$	0.05(4)	
$B_{\text{iso}} \text{ B}(\text{\AA}^2)$	0.68(6)	

Los factores de temperatura isotrópicos para las posiciones A y B medidos a 100 K son menores que los medidos a 800 K, ya que a baja temperatura las agitaciones térmicas son notablemente menores, aunque la tendencia observada de mayor agitación para los cationes en la posición B se mantiene también a esta temperatura.

La ferrita de cobalto por tanto, presenta la típica estructura ferrimagnética de las espinelas inversas, en la cual los momentos magnéticos de ambas posiciones se encuentran alineados antiparalelamente a lo largo del eje  $b$  (0,1,0) y presentan diferente magnitud, Figura 46. En la Figura 46 se muestra también la geometría y posición de los huecos octaédricos y tetraédricos dentro de la estructura.



*Figura 46. Representación de la estructura magnética y cristalina de la ferrita de cobalto, realizado con el Fullprof Suite [4].*

Sabiendo que la ferrita de cobalto, según su estructura, presenta el doble de posiciones B que de posiciones A y que los momentos de ambas posiciones se encuentran dispuestos antiparalelamente se podría estimar el momento magnético por fórmula unidad utilizando los valores  $M_A$  y  $M_B$  (Tabla 13) previamente refinados y la ecuación (4.9), obteniendo un valor de  $M_T = 2.46(14)\mu_B$ . Por tanto, a 100 K se obtienen  $2.46(14) \mu_B$  por cada fórmula unidad, este valor se encuentra entre algunos previamente publicados por D. Peddis et al [25] de  $1.85 \mu_B$  y S.M. Yunus et al [64] de  $2.99 \mu_B$  para ferritas de cobalto con similar orden de inversión. Estos magnetones equivalen a  $58.5 (3) \text{ emu/g}$ .

Con el fin de estudiar cómo es la evolución de los momentos magnéticos con la temperatura desde la región desordenada, se realizaron termodifractogramas en el instrumento D1B, desde 800 K, donde no se espera que haya contribución magnética hasta 450 K, donde el ordenamiento magnético ya se ha producido.

En la Figura 47, se representan todos los difractogramas medidos desde 800 K hasta 450 K de la muestra CoFe-25°C-AC. El paulatino enfriamiento de la muestra hasta alcanzar la temperatura de desorden, además del desplazamiento de las líneas de difracción debidas a la contracción del material, muestra una modificación de las intensidades de los picos de difracción, siendo manifiesto el aumento progresivo de la reflexión (111) en  $2\theta \ 18.9671^\circ$ , de la que es responsable mayoritaria la componente magnética.

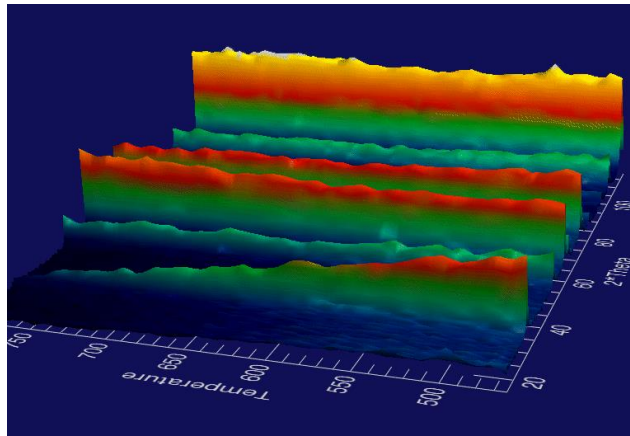


Figura 47. Representación de la evolución de las reflexiones de DN con la temperatura desde 450 K a 800 K medido en D1B.

Mediante los termodifractogramas medidos en el D1B, Figura 47, y los datos estructurales obtenidos en el D2B a 800 K (Tabla 12), se pueden refinar difractogramas a diferentes temperaturas y así obtener la evolución de los momentos de cada posición en función de la temperatura. Los resultados, se muestran en la Figura 48, evidenciándose la disminución de los momentos magnéticos hasta alcanzar valor cero en la temperatura de desorden del material.

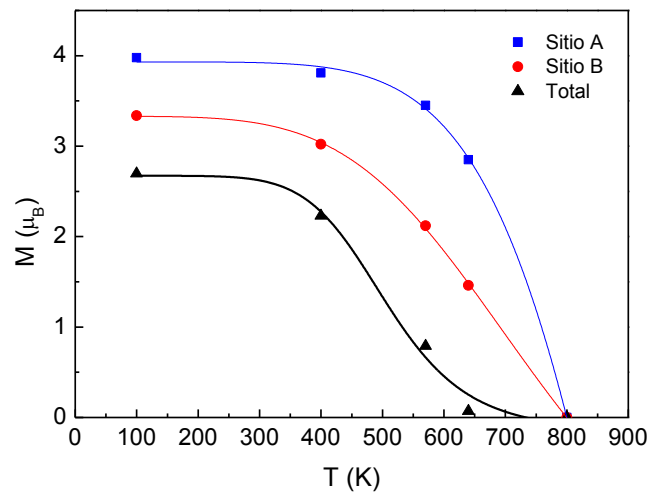


Figura 48. Representación de la evolución de los momentos magnéticos de sitios A (azul), sitios B (rojo) y total (negro) en función de la temperatura. Las líneas son una guía para el ojo.

La evolución del parámetro de red con la temperatura se representa en la Figura 49, la respuesta lineal es atribuible a procesos de dilatación del material.

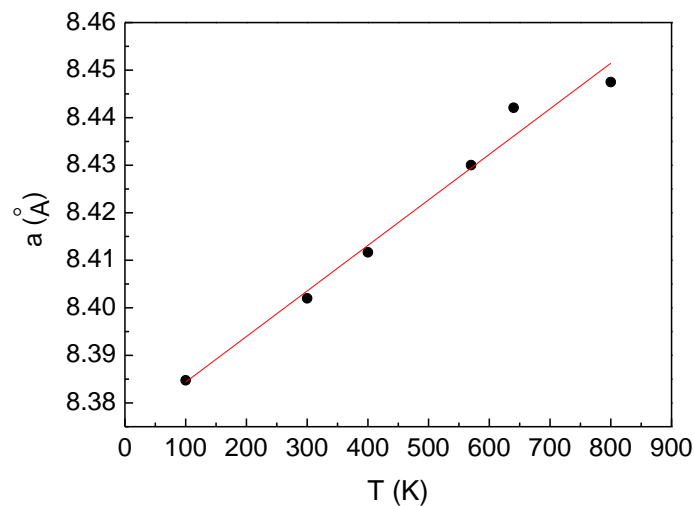


Figura 49. Variación del parámetro de red del  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  con la  $T$ , calculado mediante el refinamiento de los difractogramas por el método de Rietveld.

Del ajuste lineal del parámetro de red frente a la temperatura, en la región de 100-580 K, se obtiene el coeficiente de dilatación lineal,  $\alpha = 9,6 \cdot 10^{-5} (4) \text{ K}^{-1}$ , Figura 49, cuyo valor es superior al coeficiente de dilatación lineal de la ferrita de cobalto másica determinado entre 298 y 1273 K de  $1,21 \cdot 10^{-5} \text{ K}^{-1}$  [65]. Por tener la ferrita de cobalto simetría cúbica, su coeficiente de dilatación volumétrico se define como,  $\beta \approx 3\alpha = 2,88 \cdot 10^{-4} (6) \text{ K}^{-1}$ .

La realización de los ensayos de neutrones ha aportado conocimiento de la estructura del material, además se confirma que la estructura no presenta vacantes de oxígeno. Mediante DN también se ha determinado de forma aproximada la temperatura de desorden o de Néel, observando que ésta es próxima a 800 K. Por espectroscopia Mössbauer se determinó una  $T_0$  aproximada de 860 K. La diferencia entre ambas temperaturas se pueden entender teniendo en cuenta los diferentes tiempos de medida de ambas técnicas, DN ( $\Delta\tau_M \approx 10^{-14} - 10^{-8} \text{ s}$ ) y Mössbauer ( $\tau_M \approx 10^{-8} \text{ s}$ ), por tanto es lógico obtener una temperatura de desorden mayor en la medida de Mössbauer, ya que al ser una medida más lenta necesita de mayor temperatura para que se pueda observar la pérdida del orden a largo alcance.



## 4.6 Funcionalización de las NPs con Ácido Fólico

Una vez cumplido el objetivo de diseñar un método de síntesis de nanopartículas magnéticas de ferritas de cobalto, con notables mejoras en cuanto a dispersión de tamaños, alta cristalinidad y reproducibilidad composicional, comparado con su homólogo, el método de co-precipitación, y caracterizarlo tanto magnética como estructuralmente mediante, absorción de rayos X, espectroscopia Mössbauer, difracción de neutrones y medidas en magnetómetro SQUID, se ha procedido a vectorizar las NPs con ácido fólico (AF) que es la forma soluble en agua de la vitamina B y que es capaz de ser objetivo de células tumorales de manera similar a los anticuerpos monoclonales. Esto es gracias a que el AF presenta gran afinidad hacia los receptores de folatos, que se encuentran sobreexpresados en varios tipos de tumores humanos pero generalmente están ausentes en la mayoría de los tejidos normales [66]. En concreto el estudio de internalización celular se ha llevado a cabo con la línea celular de carcinoma humano de cuello de útero HeLa, que presenta receptores de folatos en su superficie [67, 68]. Una esquematización del proceso de anclaje de las nanopartículas sobre células con receptores de folato se muestra en la Figura 50. Similares estrategias se han llevado a cabo principalmente con magnetita [69, 70].

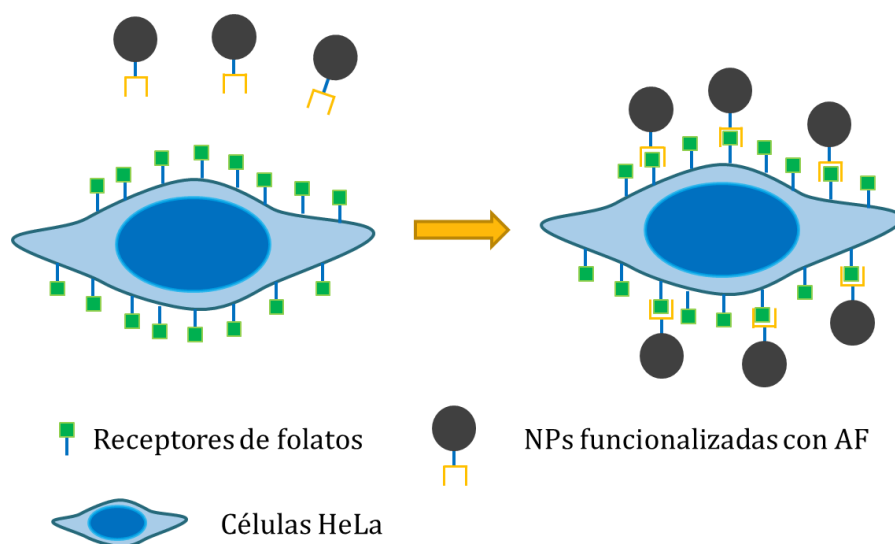


Figura 50. Representación de células HeLa con sus receptores de folatos y como las NPs funcionalizadas con ácido fólico interaccionan con la superficie celular.

El ácido fólico presenta numerosas ventajas como ligando de orientación hacia tumores diana con respecto a las macromoléculas (como los anticuerpos monoclonales), por su fácil disponibilidad, bajo coste, aplicabilidad en una amplia gama de tumores, tales como tumores de laringe, de ovario, de endometrio, colorrectal, de mama, de pulmón, de células renales, y carcinomas neuroendocrinos [66, 71-73], por su internalización vía endocitosis formando endosomas [74, 75] y porque potencialmente se podría administrar en sucesivas veces debido al pequeño tamaño en comparación con otros ligandos de orientación.

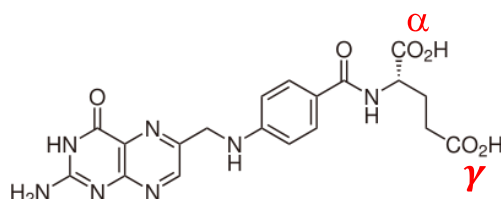


Figura 51. Estructura del Ácido Fólico. Identificación de los grupos  $\alpha$ -carboxilo y  $\gamma$ -carboxilo.

El grupo  $\alpha$ -carboxilo y no el  $\gamma$ -carboxilo del AF (Figura 51) es el responsable de la alta afinidad de enlace con los receptores de folatos de las células tumorales [66]. Por tanto, el  $\alpha$ -carboxilo no debe ser modificado o sustituido cuando al AF se encuentra inmovilizado en la superficie de las NPs para una mayor acumulación de NPs en las células tumorales. Sin embargo, estudios previos han subestimado la importancia del grupo  $\alpha$ -carboxilo del AF. Kohler et al. [76] describieron la unión del AF a un grupo amina previamente introducido sobre las NPs mediante la unión amida indistintamente tanto al grupo  $\alpha$  como  $\gamma$  carboxilo. Este enfoque produce la pérdida del grupo  $\alpha$ -carboxilo de AF durante la modificación química de las NPs magnéticas. En la presente tesis se ha realizado el recubrimiento en un solo paso y no se ha tenido en cuenta la selección o el bloqueo del grupo  $\gamma$  a la hora de funcionalizar la ferrita con ácido fólico para dejar libre el grupo  $\alpha$ , de modo que solo existirá un cierto porcentaje de grupos libres. A pesar de ello y como se verá en las secciones 4.7.1.3 y 4.8, se ha demostrado una mayor internalización en las células HeLa con receptores de folatos y nanopartículas recubiertas con AF comparadas con las recubiertas con AC.

Tras la síntesis electroquímica de la muestra CoFe(50:80)mA-25°C se funcionalizó su superficie con ácido fólico, siguiendo el procedimiento experimental descrito en el Capítulo 3, (sección 3.2.2, página 68). A partir de este momento dicha muestra recubierta con fólico de nomenclatura CoFe(50:80)mA-25°C-AF, se nombrará CoFe-25°C-AF. Se realizaron micrografías TEM a partir de las cuales se midió el diámetro de partícula tomando en cuenta al menos 100

medidas. El diagrama de barras del % de nanopartículas en función del diámetro calculado y una imagen de TEM se muestran en la Figura 52.

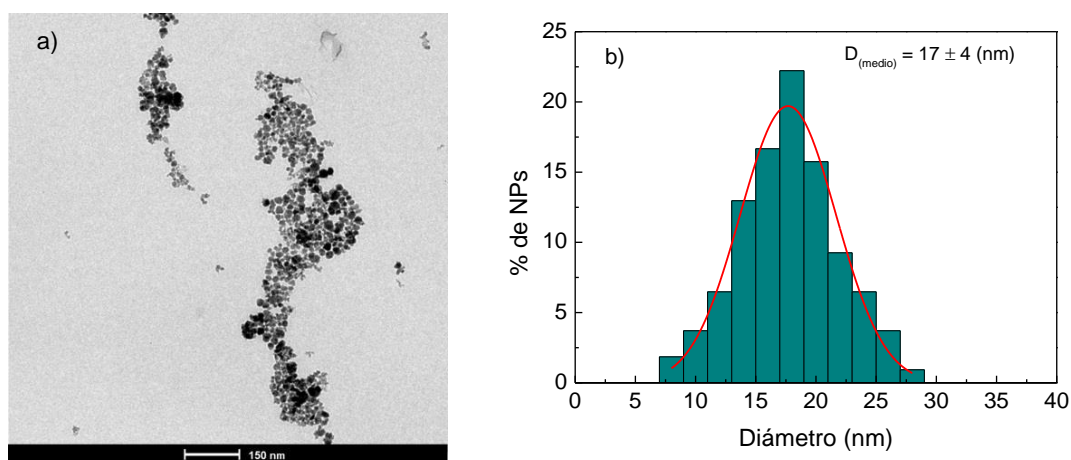


Figura 52. a) representación de la dispersión de tamaño de partículas medido por TEM. b) Micrografía electrónica de transmisión. Ambas de la muestra CoFe-25°C-AF.

El tamaño medio de partícula es de  $17 \pm 4 \text{ nm}$  similar al obtenido cuando la ferrita de cobalto se recubría con ácido cítrico, Figura 31, página 129.

Una pequeña alícuota del coloide se liofilizó para realizar el estudio de infrarrojos y el análisis termogravimétrico.

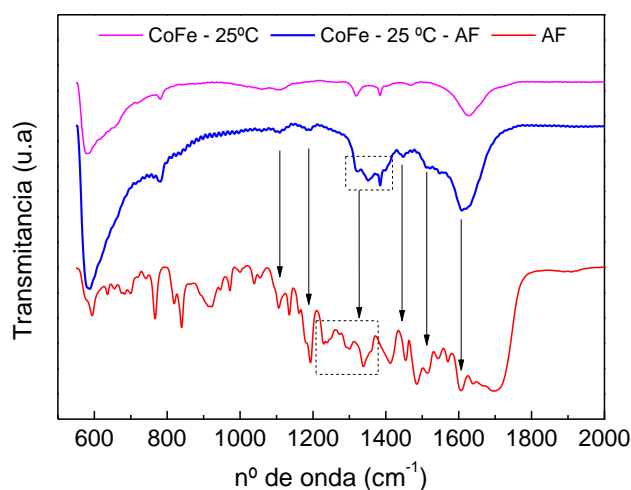


Figura 53. Espectro de Infrarrojos de la muestra CoFe-25°C-AF (azul), de la ferrita CoFe(50:80)mA-25°C con el surfactante de la síntesis NBu<sub>4</sub>Br (rosa) y el ácido fólico (rojo).

El espectro de infrarrojos de la ferrita de cobalto cubierta con ácido fólico muestra numerosas bandas atribuibles a la presencia de éste y que no aparecen en las nanopartículas sin funcionalizar. Estas bandas están indicadas mediante flechas en la Figura 53, siendo las bandas más características del AF las que aparecen entre  $1603$  y  $1694\text{ cm}^{-1}$ , así como una banda a  $1555\text{ cm}^{-1}$ , debidas a los grupos carboxilatos y amidas de la estructura del AF. El espectro de FTIR muestra claramente la funcionalización de las nanopartículas con AF.

El análisis termogravimétrico en presencia de aire se llevó a cabo para cuantificar la cantidad de material orgánico presente en la muestra funcionalizada con AF, Figura 54. Obteniéndose un valor próximo al 20% en peso de cubierta orgánica.

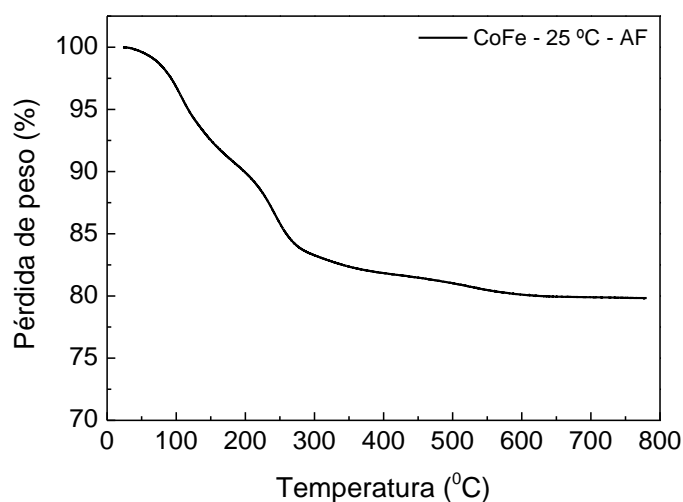


Figura 54. Análisis termogravimétrico de la muestra CoFe-25°C-AF realizado en presencia de aire, desde una temperatura de 25 °C hasta 800 °C.

En cuanto a las medidas del potencial Z, que se muestran en la Figura 55, su magnitud incrementa hacia valores más negativos con el aumento del pH, debido a la progresiva desprotonación de los grupos carboxilos del AF. El TH del coloide CoFe-25°C-AF a pH 7.2 es de 78 nm y su polidispersidad de 0.16. Las NPs son altamente estables en medio acuoso a pH 7, no muestran deterioro en el TH después de 6 meses desde la fecha de preparación. Menores valores de potencial Z a pH 7.2 han sido publicados en NPs de magnetita de  $-9\text{ mV}$  [77], y de  $-13\text{ mV}$  en NPs de magnetita en medio de tampón de fosfatos a pH 7 [78]. El potencial Z obtenido con el recubrimiento en AF es ligeramente más negativo  $\approx -25\text{ mV}$  a pH 7.2 que el obtenido en la muestra CoFe-25°C-AC que era de  $\approx -20\text{ mV}$ , indicando una mayor estabilidad del coloide formado con AF.

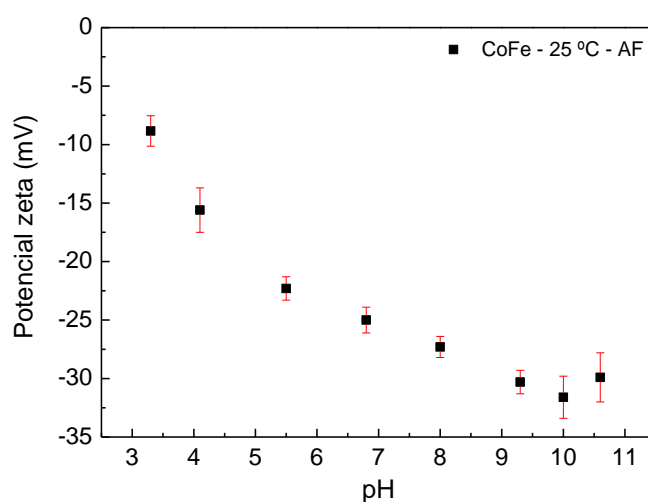


Figura 55. Medida del potencial Zeta de la muestra CoFe-25°C-AF. Realizado en medio  $10^{-2}$  M de  $\text{KNO}_3$  y distintos pHs. Para cada punto se representa la desviación estándar de al menos tres medidas.

A partir de los espectros de FTIR, y las medidas de TH y potencial Z de estos coloides se puede concluir que las nanopartículas de ferrita de cobalto se recubren de ácido fólico, aunque no ha sido posible determinar cuál de los dos carboxilos es el responsable de la carga neta negativa medida con el potencial Z. La estabilidad del coloide es elevada incluso tras el paso de 6 meses desde su preparación. A continuación se procedió al estudio de la toxicidad de los coloides CoFe-25°C-AF y CoFe-25°C-AC.

## 4.7 Toxicidad de la Ferrita de Cobalto

El uso generalizado de las NPs en biomedicina trae consigo el riesgo a una sobreexposición a este tipo de compuestos en el organismo y por tanto exige un conocimiento profundo de los posibles efectos que puedan tener. Los materiales a nivel de nanoescala son del orden del tamaño de las proteínas, afectando a sus propiedades físicas, y alterando su toxicología en comparación con el *bulk* [79, 80]. Esto puede atribuirse en gran medida a su alta relación superficie/volumen, lo que aumenta la exposición y el nivel de interacción del material con su entorno inmediato [81]. Su pequeño tamaño les permite además, llegar a estructuras intracelulares, tales como, en ciertas circunstancias, el núcleo, que son inaccesibles para materiales de mayor tamaño [82, 83]. Las NPs de óxidos metálicos además parecen afectar a la fisiología celular [84], provocando la inducción de especies reactivas de oxígeno como principal efecto [85, 86]. Por otra parte, las NPs pueden interactuar con las proteínas y afectar a su conformación y funcionalidad [87]. Además del tamaño y la forma, el recubrimiento de las nanopartículas es otro de los factores que contribuyen significativamente en el mecanismo y el grado en el que interactúan las NPs con las células. El recubrimiento también determina la estabilidad coloidal de las NPs en medio biológico y por tanto afectara a su aglomeración, y consecuentemente como ya se ha indicado al mecanismo de internalización [88, 89]. Obviamente, las diferencias en la internalización celular van a variar la cantidad de NPs dentro de las células y por tanto la citotoxicidad de las mismas [79, 84]. Un recubrimiento inadecuado, por ejemplo, con lípidos catiónicos que presenten cierta toxicidad pueden afectar a la viabilidad celular [90]. Por esta razón, diseñar un buen recubrimiento para las nanopartículas que van a ser utilizadas en aplicaciones biomédicas es de vital importancia, para favorecer unos niveles de partículas en las células adecuados sin producir muerte celular [91, 92].

Uno de los problemas en la evaluación de la toxicidad de estos materiales es que no existen unos criterios estandarizados, y muchos factores tales como el tipo de ensayo realizado, la composición de las NPs y su concentración, la línea celular o el tiempo de incubación utilizados pueden influir en el resultado final [84].

Las NPs magnéticas más utilizadas en aplicaciones biomédicas y más referidas en la bibliografía son las NPs de óxidos de hierro, habiendo sido aprobado su uso por la FDA en 1996 y comercializadas por Feridex en EEUU y Endorem en la UE [93]. Debido a la importancia que tienen los óxidos de hierro en biomedicina, los estudios sobre su toxicidad son más abundantes que en el caso de otro tipo de partículas. Por ejemplo, Berry y col. [94] compararon la citotoxicidad de las NPs de óxidos de hierro, y concluyeron que las NPs alteraban el comportamiento y la morfología de las

células, dependiendo del recubrimiento superficial, modificándose el modo en que internalizan con el tipo de recubrimiento de las mismas [95].

Por el contrario estudios sobre la toxicidad de las ferritas de cobalto son menos frecuentes. Colognato y col. [96] demostraron la toxicidad de ferritas de cobalto de 5.6 nm sin recubrir. En cambio las ferritas de cobalto de mayor tamaño, 10 nm e incluso partículas de 120 nm no exhibían citotoxicidad. Otro hecho importante en este estudio es que una cubierta orgánica de las NPs de 5.6 nm disminuía cuatro veces el nivel de toxicidad. Recubrimientos con sílice de hasta 50 nm de espesor, no revelaron efectos tóxicos [97]. Otros estudios han demostrado que las ferritas de cobalto de 10 nm recubiertas con ácido poliacrílico (PAA) no son tóxicas con la línea celular CHO (células derivadas de ovario de hámster chino), al menos hasta las concentraciones ensayadas de 0.2 mg/ml [98]. En cambio, ferritas de cobalto recubiertas con silanos mostraban cierta toxicidad, pero menor que sin recubrir [99]. También el tipo celular estudiado tiene gran importancia en las conclusiones sobre la internalización y toxicidad de las nanopartículas. Por ejemplo se han realizado estudios de citotoxicidad con ferritas de cobalto de TH = 13.6 nm sintetizadas por el método de polioles, con siete tipos diferentes de líneas celulares, no mostrando efectos tóxicos en concentraciones  $\leq 200 \mu\text{M}$  para ninguna línea celular a tiempos de incubación de 24 y 72 h [100]. Para concentraciones  $> 200 \mu\text{M}$  los efectos tóxicos eran mayores y dependían del tipo de línea celular. En concreto las células A549 eran sensibles solo para concentraciones de 900  $\mu\text{M}$  y pasadas 72 h de la incubación [100].

Por todo lo expuesto, el estudio de la estabilidad química que presentan las NPs al medio desintegrativo de los endosomas está recibiendo recientemente gran atención. Típicamente, las NPs son internalizadas por endocitosis y durante dicho proceso estarán expuestas a muy diversas condiciones, tales como cambios en el pH de 7,4 en medio extracelular, pH 5,5 en endosomas tardíos y pH 4,5 en lisosomas. Además de estos pHs ácidos, los lisosomas también contienen altos niveles de enzimas hidrolíticas que pueden producir la degradación de la totalidad del revestimiento o incluso de las NPs. La exposición de la superficie de las NPs en el medio ácido desintegrativo puede tener efectos importantes en la NP en sí misma, este efecto está relacionado con la posible liberación al medio de los iones metálicos que las componen. Por otra parte, las deformaciones de la superficie de la NPs pueden tener profundos efectos en sus propiedades físicas. Así, la pregunta a la que hay que responder sigue siendo ¿cómo de funcional es la cubierta orgánica que protege a las NPs después de un tiempo prolongado en el entorno de los lisosomas?, teniendo en cuenta que para muchas NPs, como CdSe, Ag, ZnO la liberación de iones se considera una causa importante de toxicidad [101]. Todas las NPs son susceptibles a la degradación inducida por el medio ácido, el grado en el cual esta degradación se produzca dependerá de la naturaleza del recubrimiento. Tras la liberación de los

iones metálicos, se observan altos niveles de estrés oxidativo y esto se correlaciona con la pérdida de la viabilidad celular.

Por lo tanto, el siguiente objetivo planteado es evaluar la toxicidad *in vitro* de las muestras CoFe-25°C-AF y CoFe-25°C-AC. Se ha evaluado el efecto del tamaño, el tipo de funcionalización, la línea celular utilizada y el tiempo de incubación de las NPs en la viabilidad celular.

#### 4.7.1 Estudio de viabilidad celular (toxicidad)

##### 4.7.1.1 MTT con diferentes tamaños hidrodinámicos

Se ha estudiado la viabilidad celular, mediante el método colorimétrico (MTT) (capítulo 3, sección 3.5.2, página 86), con la línea celular HeLa y ferritas de cobalto de diferente tamaño hidrodinámico, para lo cual se han empleado las muestras: CoFe-25°C-AC (TH<), (recordemos CoFe(50:80)mA-25°C-AC) y CoFe-60°C-AC (TH >), (recordemos, CoFe(50:90)mA-60°C-AC). Como se puede observar en la Figura 56, en ninguno de los ensayos la incubación de nanopartículas implica toxicidad para las células, al menos hasta las concentraciones analizadas. Como ya se ha indicado anteriormente, en general la citotoxicidad es dependiente del tamaño y más concretamente del TH (nanopartícula + recubrimiento), siendo más tóxicas aquellas que presentan menor TH. Este efecto es debido al aumento del área efectiva en las NPs pequeñas, y por tanto una mayor capacidad de adsorción. Las NPs más grandes son incorporadas al espacio intracelular de una forma menos eficiente y más retardada [86]. Además de la cantidad de NPs internalizadas, parece que el tamaño de las NPs puede afectar el modo en que son endocitadas.

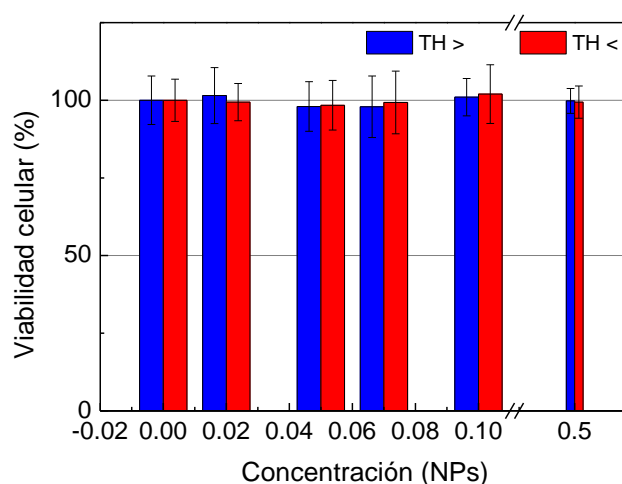


Figura 56. Análisis de la toxicidad mediante MTT de las NPs CoFe-25°C-AC (TH<) y CoFe-60°C-AC (TH>) incubadas durante 24 horas con la línea celular HeLa y resueltas a tiempo 0 horas.



En cuanto al estudio morfológico, cualitativamente se puede observar como la internalización celular, es menos evidente para las de mayor TH (TH  $\approx$  184 nm), Figura 57. De este modo se verifica que el TH hidrodinámico es un factor altamente importante a la hora de mejorar la eficiencia de la internalización, obteniéndose mayor cantidad de NPs en el interior de las células para la ferrita de cobalto con menor tamaño, aunque esta mayor incorporación no tiene como ya ha quedado reflejado ningún efecto negativo en la toxicidad.

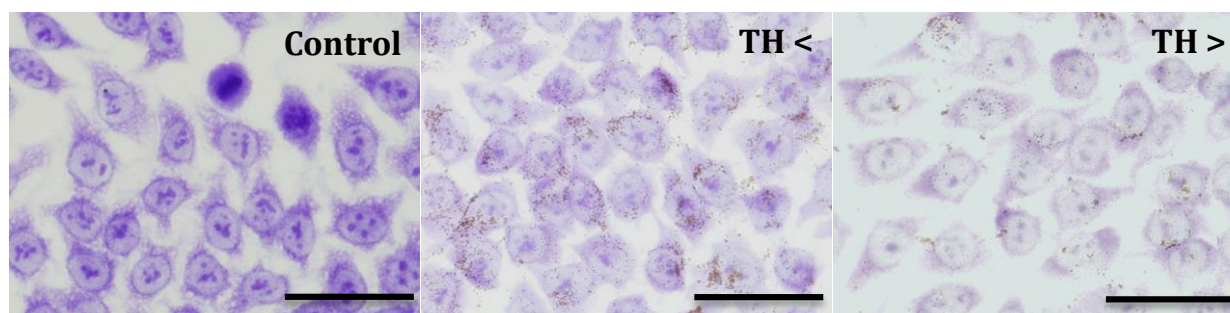


Figura 57. Estudio morfológico de las NPs referidas en la Figura 56 incubadas en células HeLa. Para una concentración de NPs de 0.1 mg/ml. Se muestra a modo de referencia el control (células sin NPs). Escala 62.7  $\mu$ m. Todas ellas teñidas con TB y tomadas con microscopio óptico en campo claro.

#### 4.7.1.2 MTT con diferentes líneas celulares

Además de evaluar el efecto del TH en la toxicidad de células HeLa (células derivadas de carcinoma cervical humano), se han realizado ensayos de viabilidad celular para dos tipos de líneas celulares, HeLa, y Vero (células epiteliales de riñón de mono verde), mediante el método colorimétrico MTT, estos experimentos se llevaron a cabo debido a que la internalización de las nanopartículas y su toxicidad puede variar dependiendo del origen y de la capacidad de proliferación de cada una de las líneas celulares [102]. Los experimentos fueron realizados incubando las NPs funcionalizadas CoFe-25°C-AC durante 24 horas en medio de cultivo celular y resolviendo la supervivencia a tiempo 0 h.

El ensayo de viabilidad celular, Figura 58, resultó ser próximo al 100% en todos los casos. Augurando una buena respuesta de supervivencia al menos en las concentraciones y tiempos de incubación ensayados. Se realizó un estudio morfológico para comprobar si las NPs habían entrado dentro de las células o se habían alojado en el exterior celular, Figura 59.

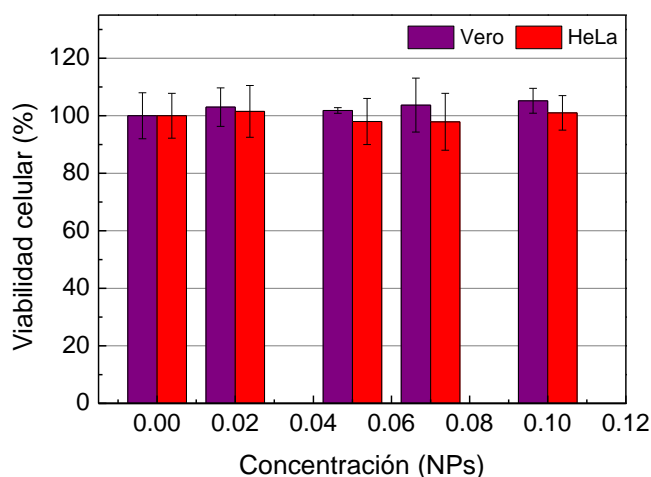


Figura 58. Análisis de la toxicidad mediante MTT de las NPs CoFe-25°C-AC, incubadas durante 24 horas con las líneas celulares HeLa y Vero y resueltas a tiempo 0 horas.

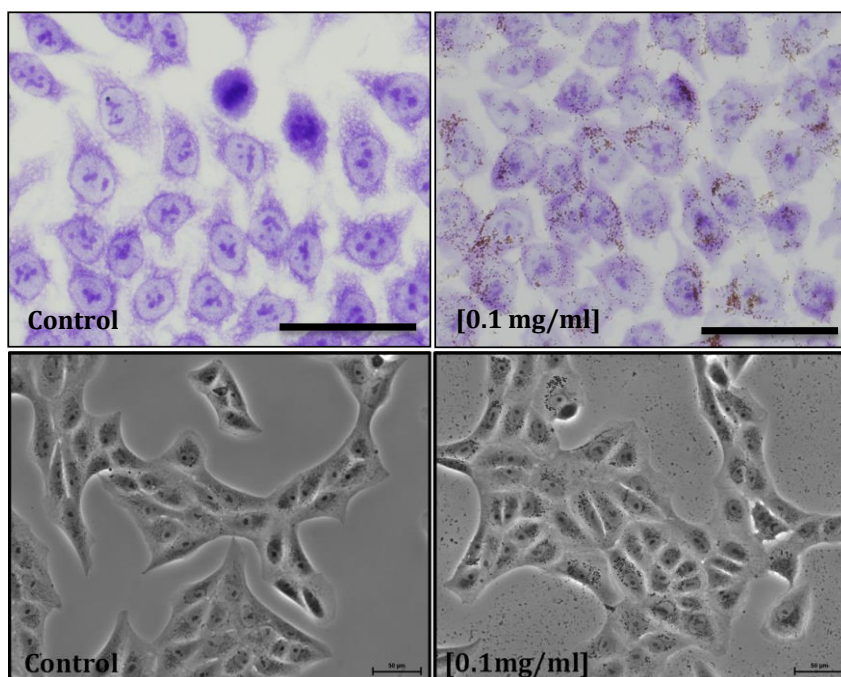


Figura 59. Estudio morfológico de las células tras 24 h de incubación con NPs CoFe-25°C-AC para una concentración de NPs de 0.1 mg/ml, en la parte superior se muestra la línea celular HeLa teñidas con TB (escala 62.7  $\mu\text{m}$ ) y en la inferior la línea celular Vero. Todas ellas tomadas con microscopio óptico en campo claro.

Cualitativamente se puede comprobar que las NPs se encuentran en el interior celular, situadas alrededor del núcleo, tanto en Vero como en HeLa, aunque también quedan algunas ubicadas en el medio extracelular. Mediante estas micrografías no es posible determinar en qué línea celular las nanopartículas se internalizan mejor, solo es posible concluir que en las condiciones empleadas las nanopartículas no presentan toxicidad en ninguna de las líneas celulares.

#### 4.7.1.3 MTT con diferentes recubrimientos

A continuación se valora si la cubierta de cítrico o de fólico de las NPs CoFe-25°C-AC y CoFe-25°C-AF afectaba a la supervivencia celular. Como algunos trabajos han demostrado [103], la cubierta de cítrico se degrada con relativa facilidad en el interior celular mientras que la cubierta de fólico es una cubierta de vectorización, que facilitará una mayor internalización. La supervivencia celular, que se muestra en la Figura 60, no presenta diferencias notables con el uso de los dos recubrimientos, alcanzándose en ambos casos valores muy cercanos al 100% de supervivencia.

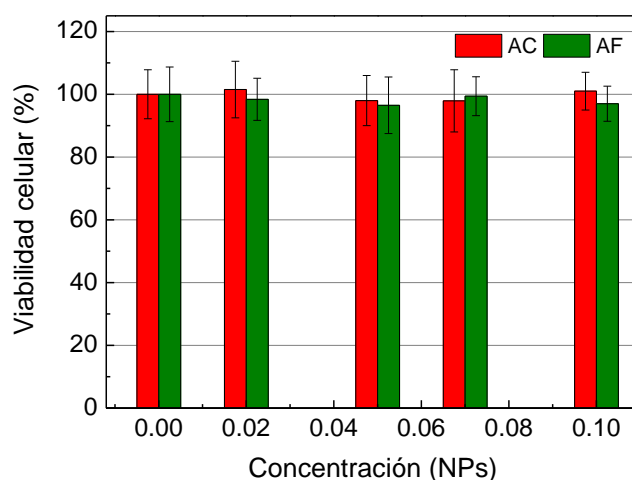


Figura 60. Análisis de la toxicidad mediante MTT de las NPs CoFe-25°C-AC y CoFe-25°C-AF, incubadas durante 24 horas con la línea celular HeLa y resueltas a tiempo 0 horas.

Del estudio morfológico que se muestra en la Figura 61, se puede indicar de una forma aproximada que las nanopartículas recubiertas con AF internalizan más efectivamente en las células HeLa que las nanopartículas recubiertas con AC. De modo general, debido a la carga negativa que exhibe la membrana plasmática, las NPs catiónicas son endocitadas en mayor grado que las negativas o neutras [104], a pesar de ello, las NPs cargadas negativamente, aunque en menor medida, también pueden ser internalizadas por la célula [105] como demuestra la Figura 61, ya que la carga neta que poseen ambos recubrimientos es negativa y de carga similar. Sin embargo, no sólo las cargas tienen un efecto en la internalización de las NPs, también la endocitosis puede ser modificada añadiendo ligandos específicos a la superficie de las mismas, como en este caso ácido fólico que aumenta la internalización celular.

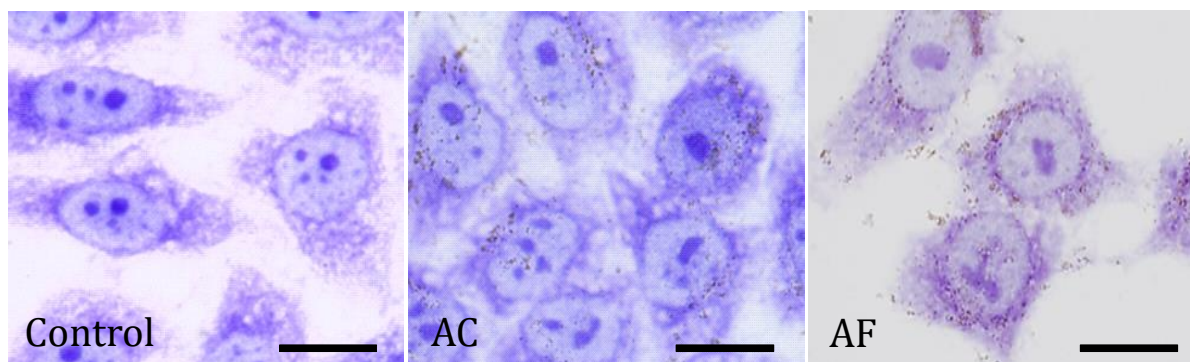


Figura 61. Estudio morfológico de las NPs referidas en la Figura 60. Para una concentración de NPs de 0.05 mg/ml y 24 h de incubación. Se muestra a modo de referencia el control (células sin NPs). Todas ellas teñidas con TB y tomadas con microscopio óptico en campo claro (escala 12.5µm).

De los resultados obtenidos hasta el momento se puede concluir que las NPs con TH menor internalizan mejor, a pesar de que la cubierta negativa no favorezca dicho proceso. Ninguno de los ensayos MTT en función de TH, cubierta y líneas celulares mostró indicios de toxicidad, manteniendo las células su morfología aparentemente inalterada. Cualitativamente también se ha demostrado como la cubierta de AF favorece la internalización celular (para TH semejantes), en comparación con la cubierta de AC.

Para estudiar con más detalle la viabilidad celular en función del tiempo de incubación, 6 y 24 h, se escogieron dos tipos de nanopartículas CoFe-25°C-AC y CoFe-25°C-AF, empleando una concentración intermedia de las mismas de 0.05 mg/ml. La Figura 62 muestra el porcentaje de viabilidad una vez realizado el MTT tras 24 h retiradas las NPs.

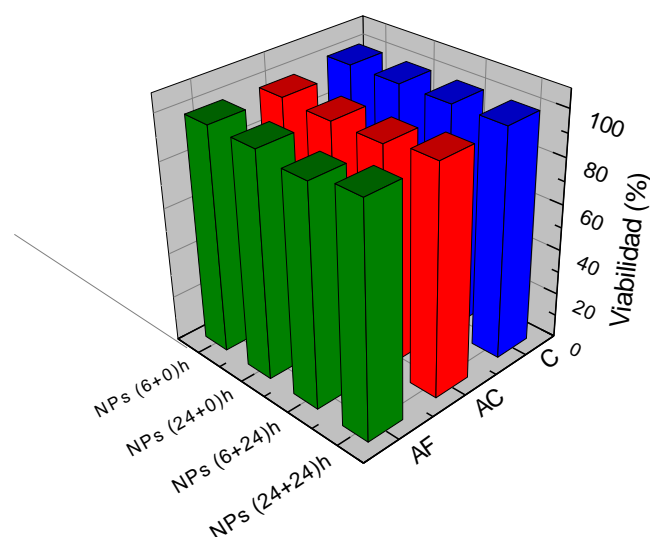


Figura 62. MTT para la concentración 0.05 mg/ml de las muestras CoFe-25°C-AC (rojo) y CoFe-25°C-AF (verde), para diferentes tiempos de incubación (eje X, primer número entre paréntesis) y procesado (eje X, segundo número entre paréntesis), realizadas con la línea celular HeLa. En azul se muestra el control de cada experimento.

En todos los casos, la supervivencia celular fue muy próxima al 100%, lo que indica que una vez retiradas las NPs y transcurridas 24 h, las células son capaces de mantener su ciclo celular. En cuanto al estudio morfológico, que se muestra en la Figura 63, se aprecian notables diferencias en la internalización celular para un tiempo de 6 h.

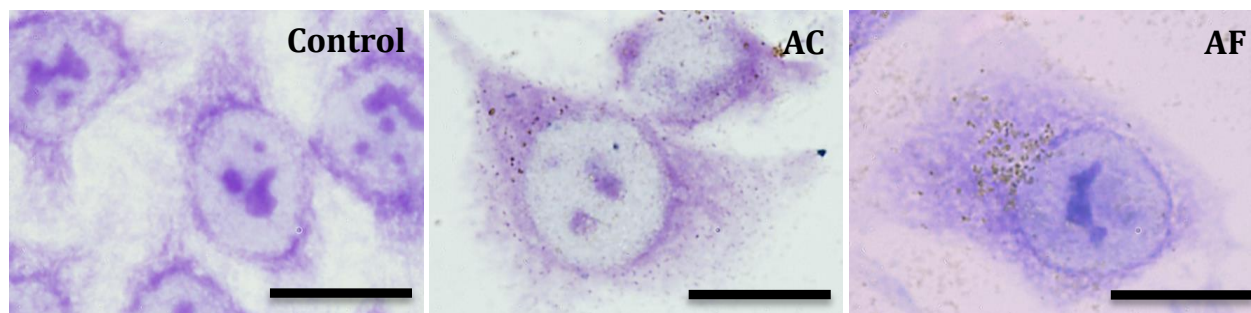


Figura 63. Estudio morfológico tras 6 h de incubación de las células con las CoFe-25°C recubiertas con AC o con AF. Para una concentración de NPs de 0.05 mg/ml. Se muestra a modo de referencia el control (células sin NPs). Todas ellas teñidas con TB y tomadas con microscopio óptico en campo claro (escala 20  $\mu$ m).

En el caso de NPs con cubierta de cítrico son escasas las NPs que se observan en el interior celular, por el contrario las recubiertas con fólico, para el mismo tiempo de incubación, se encuentran en mayor cantidad dentro de las células.

La determinación cualitativa de que las NPs con cubierta de AF entraban en el interior de las células a tiempos más cortos y en mayor cantidad focalizó el estudio morfológico del citoesqueleto sobre la muestra CoFe-25°C-AF, sección 4.7.2, página 166.

#### 4.7.1.4 MTT de los ensayos *in vitro* de Resonancia magnética de imagen

En esta sección se van a mostrar los ensayos MTT realizados a modo de control a partir de las concentraciones utilizadas en los ensayos *in vitro* de resonancia magnética de imagen (0.025, 0.05 y 0.25 mg NPs/ml) con el coloide CoFe-25°C-AF en células HeLa (Capítulo 4.8, página 169). En la Figura 64, se aprecia claramente, que no existe una reducción notable en la supervivencia celular.

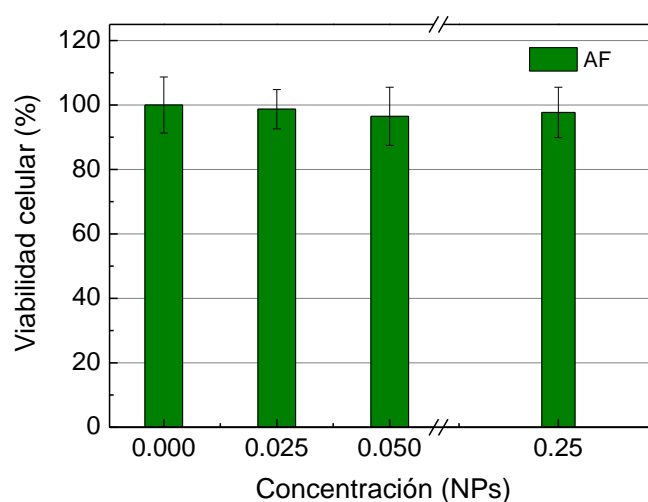


Figura 64. Ensayos MTT en células HeLa, del coloide CoFe-25°C-AF, correspondiente a la preparación de los ensayos *in vitro* de RMI referidos en la Figura 68.

En la Figura 65, se muestran los ensayos de citotoxicidad de las muestras *in vitro* con las líneas celulares A-549 y HeLa para los coloides recubiertos con AC y AF a una concentración de 0.05 mg/ml y tiempo de incubación 24 h, no mostrándose efectos tóxicos destacables. Estas concentraciones son las correspondientes a los ensayos de RMI mostrados en la Figura 72, página 174 del capítulo 4.8.

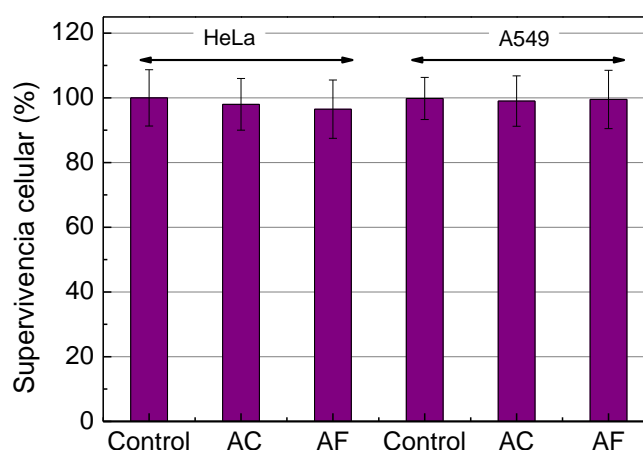


Figura 65. Ensayos MTT de las muestras *in vivo* medidas en RMI. Concentración de coloides CoFe-25°C-AC y CoFe-25°C-AF de 0.05 mg/ml y líneas celulares A-549 y HeLa.



#### 4.7.2 Estudio de la morfología y el citoesqueleto celular en CoFe-25°C-AF.

Las células, presentan una compleja red de filamentos proteicos que se extiende a través del citoplasma formando un armazón interno que mantiene todo el volumen citoplasmático y que recibe el nombre de citoesqueleto. Esta estructura es muy dinámica y se reorganiza continuamente mientras la célula cambia de forma, se divide y responde a su entorno. Las diversas actividades del citoesqueleto dependen sobre todo de tres tipos distintos de filamentos proteicos: filamentos de actina, microtúbulos y los filamentos intermedios. Cada tipo de filamento está formado por una subunidad proteica distinta, actina para los filamentos de actina, tubulina para los microtúbulos y una familia de proteínas fibrosas relacionadas entre sí y variable para cada tipo celular para los filamentos intermedios (vimentina, citoqueratina, láminas).

Estos filamentos conectan complejos proteicos y orgánulos de regiones distintas de la célula y actúan a modo de rieles para el transporte entre ellos. Además forman el soporte mecánico que es especialmente importante en las células animales, que no disponen de paredes rígidas externas. Los microtubulos son componentes esenciales de las células eucariotas, ya que durante la interfase son responsables del transporte intracelular y contribuyen al mantenimiento de la arquitectura de la célula, y durante la mitosis son responsables de la separación cromosómica, motivo por el cual han sido considerados un importante blanco de las drogas quimioterapéuticas, ya que las células cancerosas se caracterizan por alto nivel de proliferación lo que determina una elevada actividad mitótica.

Los filamentos de actina en las células no solo desempeñan funciones estructurales o están implicados en el movimiento de la célula sino que también interactúan con otras proteínas que les unen a proteínas insertadas en la membrana celular, (contactos focales). Mediante el establecimiento de estas uniones se producen algunas de las comunicaciones entre el interior de la célula y la matriz extracelular, lo que permite cooperar a las células de un tejido que no están unidas directamente entre sí. Otra de las funciones desempeñadas por la actina es participar en la formación del anillo contráctil que separa las células hijas resultantes de un proceso mitótico. Debido a esas funciones es evidente que la actina está también implicada en los procesos de carcinogénesis donde las células metastáticas pierden la adhesión al sustrato y son capaces de emigrar a órganos distintos del que se formaron. El citoesqueleto de la célula juega un papel muy importante en la internalización y distribución de los materiales endocitados. La actina tiene un papel importante en la internalización de moléculas por diferentes rutas (entre ellas las mediadas por clatrina y caveola) y los microtúbulos formados por tubulina son necesarios para el movimiento de las vesículas una vez en el interior celular.

La incubación de células con NPs puede resultar dañina para la célula, desestructurando la morfología del citoesqueleto celular [106]. Por tanto, una manera de estudiar el efecto de las NPs para ver si existen modificaciones en el citoesqueleto, es marcar proteínas del mismo (actina, tubulina) con fluoróforos y analizar las células mediante microscopía de fluorescencia [107]. La visualización de los filamentos en microscopía de fluorescencia se puede realizar mediante un mecanismo de inmunofluorescencia indirecta tratando las células con anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y posteriormente utilizando un anti-anticuerpo marcado con el fluorocromo (anticuerpo secundario).

Para estudiar, por tanto, si era posible detectar cambios en el citoesqueleto celular al incubar las células con las NPs, se realizaron estudios de inmunofluorescencia en los que se marcaron fluorescentemente la actina, y la tubulina (Figura 66).

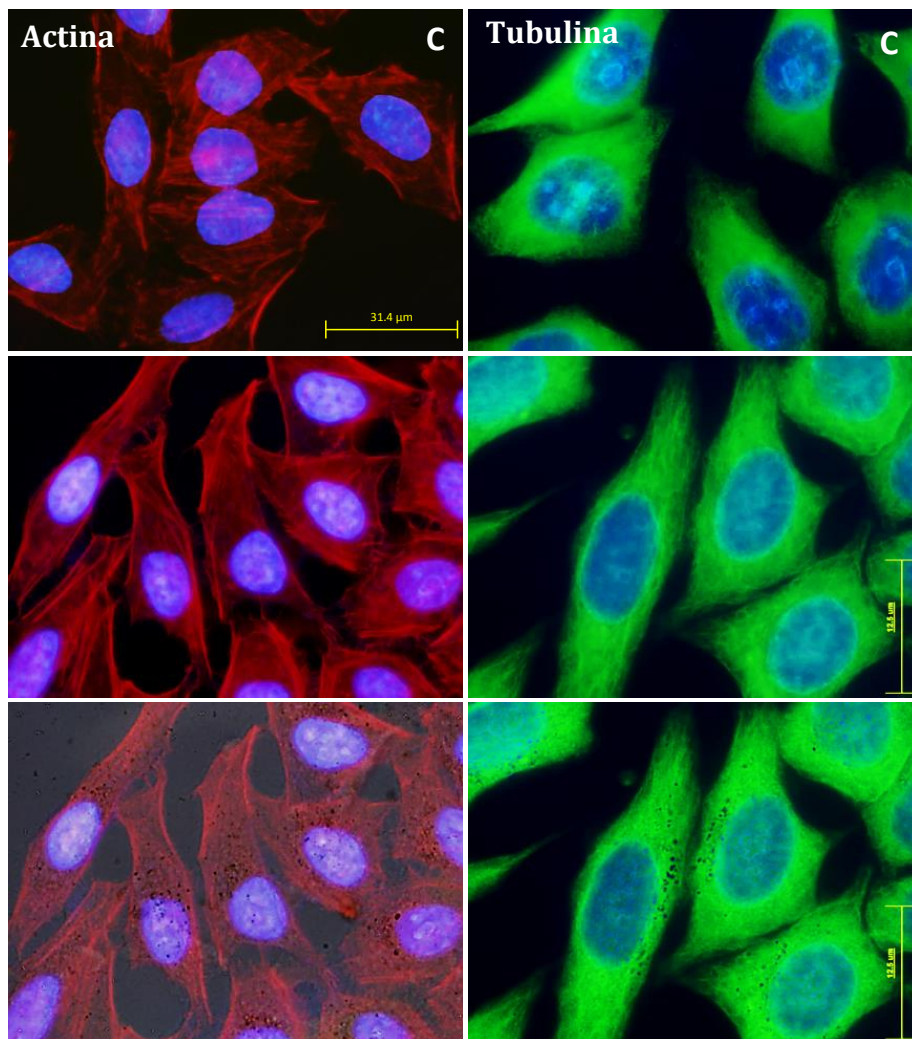


Figura 66. Imágenes de microscopía confocal de las células HeLa sin NPs o control (C). Las imágenes inferiores son células con NPs de CoFe-25°C-AF (0.05mgNPs/ml) incubadas 24 h. Fibras de actina magnificación 40x, fibras de tubulina magnificación 60x.



Tanto en las células control como en las incubadas con NPs, la actina y la tubulina están bien organizadas. Las fibras de actina deben atravesar toda la célula y no encontrarse difusas en ningún punto, y la tubulina debe observarse como fibras individuales que radian desde el centro organizador localizado cerca del núcleo hacia la periferia celular.

Como se ha comentado previamente, las moléculas de AF ancladas a la superficie de las NPs podrían ser utilizadas para la vectorización de las NPs a las células HeLa. La carga superficial negativa de este coloide no va a priori a favorecer la entrada de las mismas en el interior celular pero la posible vectorización hacia células con receptores de folatos las va conferir cualidades para la internalización que las NPs recubiertas con cítrico no poseen.

Para que tanto la resonancia magnética de imagen como el tratamiento de hipertermia sean lo más eficaces posible, las NPs funcionalizadas deben entrar con facilidad en el interior celular, en la mayoría de los casos el mecanismo de internalización debe ser por endocitosis, pero dependerá de la línea celular, la forma, el tamaño, la carga superficial, el estado de agregación, la hidrofobicidad etc... Como puede verse, la internalización de las NPs es muy compleja y depende de muchos factores, por lo que en principio no se puede generalizar ni prever un comportamiento típico para los nanomateriales. El marcaje de las NPs con un fluoróforo y el estudio del efecto que presenta la modificación de cada uno de estos parámetros en el tipo de mecanismo de endocitosis es un amplio estudio que se podrá abarcar en trabajos futuros.

## 4.8 Resonancia Magnética de Imagen

El estudio de las propiedades relaxométricas se llevó a cabo midiendo los tiempos de relajación del protón ( $T_1$  y  $T_2$ ) para las ferritas de cobalto CoFe-25°C-AC y CoFe-25°C-AF a diferentes concentraciones de metales (Fe+Co). El tamaño de partícula de estas muestras calculado por TEM como ya se ha mencionado es de 18 y 17 nm respectivamente y la relación  $[\text{Fe}]/[\text{Co}]$  igual a 2.0. La Figura 67 muestra las medidas del tiempo de relajación para la muestra CoFe-25°C-AF. Los valores de la relajatividad ( $r_1$  y  $r_2$ ) se calcularon, como la pendiente que resulta al representar el inverso de los tiempos de relajación longitudinales  $T_1$  o transversales,  $T_2$  en segundos, frente a concentraciones crecientes del agente de contraste expresadas en mM, y se muestran en la Tabla 14 para ambos coloides.

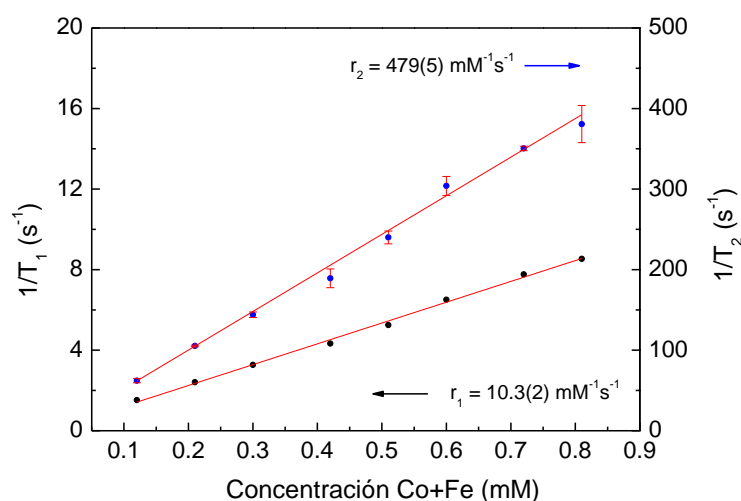


Figura 67. Tiempos de relajación  $T_1(s^{-1})$  o longitudinales y  $T_2(s^{-1})$  o transversales frente a concentraciones crecientes de la muestra CoFe-25°C-AF. Se adjuntan las relajatividades  $r_1$  y  $r_2$ .

La relajatividad de ambas muestras (Tabla 14) es semejante, como era de esperar, ya que el tamaño de partícula, la composición y la magnetización de saturación es muy similar para ambas muestras, y la diferencia en el recubrimiento no genera grandes variaciones. En cambio, los valores obtenidos son muy superiores comparados con los valores de  $r_2$  de los agentes comerciales basados en óxidos de hierro, Tabla 15. La mejoría de estos valores supondría en principio la necesidad de una dosis menor del material para obtener rendimientos semejantes a los comerciales. Los valores encontrados en la bibliografía de ferritas de cobalto como agente de contraste tipo  $T_2$ , son escasos, siendo superiores los valores obtenidos en esta tesis a los reflejados en la Tabla 15.

Tabla 14. Relajatividades en T1 y T2 de las muestras CoFe-25°C-AF y CoFe-25°C-AC.

	r1	r2	r2/r1
<b>CoFe - 25 °C - AC</b>	9.8	462	47.1
<b>CoFe - 25 °C - AF</b>	10.3	479	46.5

Tabla 15. Valores de relajatividad, de tamaño de partícula y de recubrimiento de agentes de contraste comerciales y suspensiones de partículas de ferrita de cobalto de la bibliografía.

Comerciales [108]	Material	Recubrimiento	D <sub>(Tem)</sub> (nm)	r1	r2	r2/r1
Sinerem	$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Dextrano	4-15	9.9	65	7
Resovist		Carboxidextrano	4-15	9.7	189	19
VSOP_C184		Ácido cítrico	5	14	33.4	2
Endorem		Dextrano	4-15	10.1	120	12
Bibliografía	Material	Recubrimiento	D <sub>(Tem)</sub> (nm)	r1	r2	r2/r1
J.H. Lee y col.[109]	CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	DMSA			172	
Schultz-sikma y col.[110]		Sílice	7		142	
Hrushikesh M. Joshi y col. [111]		Acido 11-aminoundecanoico	15		301	
D.H. Kim y col.[36]		DMSA	8	6	392	62
Venkatesha, N. y col.[112]		Quitosano	6 <sup>a</sup>		32	
Liu y col. [113]		Citrato	37.89	27.8	75.1	2.7

En cuanto a la utilización de los coloides ensayados en fase *in vitro*, se utilizó en primer término el coloide CoFe-25°C-AF con la línea celular HeLa, en concentraciones de NPs de 0.025, 0.05 y 0.25 mg NPs/ml y tiempo de incubación de 24 horas. Tras el periodo de incubación las muestras fueron lavadas, tripsinizadas, fijadas con etanol y diluidas en PBS hasta ocupar el volumen de 1.5 ml de un tubo eppendorf. Las imágenes ponderadas en T2 de las células HeLa dispersas en PBS, se pueden observar en la Figura 68. Se observa una clara tendencia de incremento del contraste negativo con el incremento de la concentración de NPs incubadas en ese mismo periodo, relacionado con una mayor internalización celular. Cabe destacar, como ya se ha visto en la sección 4.7.1, Figura 64, página 165, que cada ensayo o preparación de estudio *in vitro* se complementó con el correspondiente estudio de viabilidad celular por el método MTT, donde en este caso se observó que el coloide recubierto con ácido fólico no muestra toxicidad a las 24 h de incubación y hasta las concentraciones ensayadas.

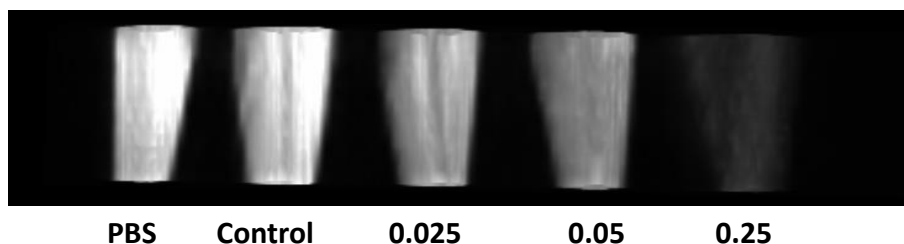


Figura 68. Imágenes ponderadas en T2 de las células HeLa con diferentes concentraciones de NPs de CoFe-25°C-AF, incubadas 24 h. Comparadas con el contraste de células sin NPs y con PBS.

Los valores relativos de reducción de la intensidad de la señal en comparación con la señal obtenida para el control en función de la concentración de cada muestra se puede observar en la Figura 69.

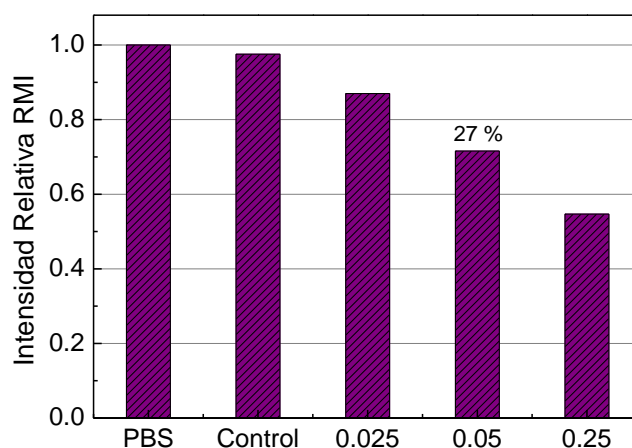


Figura 69. Comparativa de la reducción de la señal de intensidad de RMI, para PBS, células control, y células con concentración variable de NPs – CoFe-25°C-AF, obtenida de las imágenes de la Figura 68.

Una reducción del 27% se obtiene en el caso de utilizar 0.05 mg NPs/ml o lo que es lo mismo 26  $\mu\text{g}$  Fe/ml. Similares valores se han publicado para NPs de magnetita funcionalizadas con AF a través de la estrategia EDC/NHS, donde la reducción de la intensidad de la señal con muestras de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 6 h de incubación es del  $\approx 35\%$  [114] con la línea celular KB. Escasos son los artículos referidos a ferritas de cobalto funcionalizadas con AF, Park y col. [115] estudiaron la reducción en la señal T2 debido a la mayor internalización en diferentes líneas celulares cancerosas, pero de forma cualitativa.

Una figura más visual de la relación de reducción de la señal con la concentración se muestra en la Figura 70, esta dependencia se muestra lineal hasta la concentración de 0.05 mg NPs/ml, para concentraciones superiores la disminución de la señal deja de ser lineal, lo que aporta información de que las células son capaces de internalizar solo una cierta cantidad de NPs hasta que se sobresaturan [116] y concentraciones tan elevadas como la de 0.25 mg NPs/ml no mejora en exceso la señal de resonancia. Por tanto, para realizar el estudio de la especificidad de las NPs recubiertas con ácido fólico se fijó la concentración de NPs en 0.05 mg/ml.

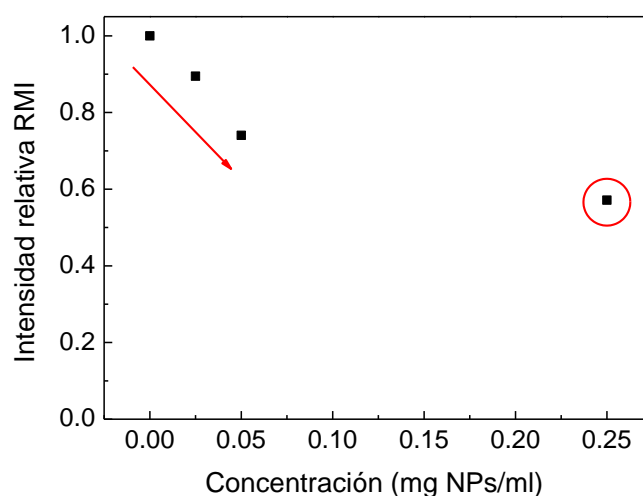


Figura 70. Representación de la dependencia de la concentración con la reducción significativa de la señal de RMI T2.

Para investigar la función del AF como molécula de vectorización y la efectividad del diseño de la superficie en la internalización de la ferrita de cobalto en células diana (HeLa), las células HeLa fueron incubadas con las muestras CoFe-25°C-AF y CoFe-25°C-AC a modo de control, para la concentración de 0.05 mg NPs/ml y 24 h de tiempo de incubación. Los valores de la cantidad de Fe presente en las muestras de células HeLa con CoFe-25°C-AF y CoFe-25°C-AC tras las 24 h de incubación se midieron mediante TXRF. El valor de Fe obtenido se relacionó con el número de células existentes en cada muestra.

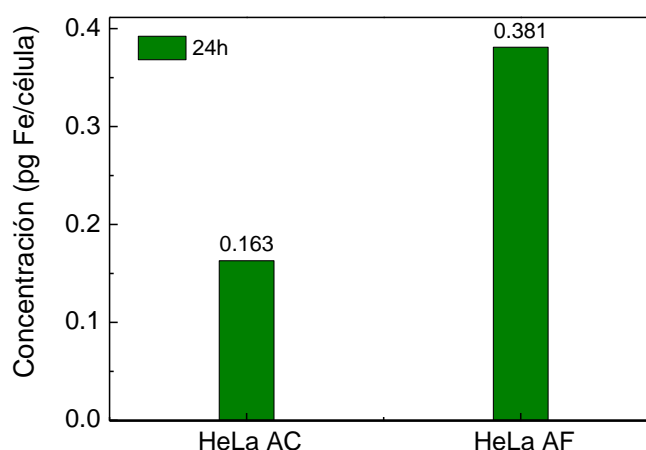
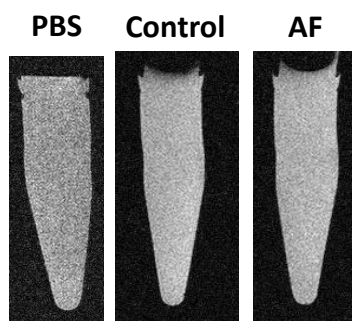


Figura 71. Cuantificación de la cantidad de Fe por célula existente en las muestras de células HeLa incubadas durante 24 h con CoFe-25°C-AC y CoFe-25°C-AF.

Según la Figura 71, las células con NPs recubiertas con ácido fólico presentan cerca del doble de cantidad de Fe por célula, 0.381 pg/célula con AF y 0.163 pg/célula con AC, confirmando una mayor internalización de las NPs cuando se encuentran vectorializadas hacia células que sobreexpresan receptores de folatos en su superficie (HeLa). En cuanto a la bibliografía existen estrategias diferentes de adhesión de los folatos a la superficie, generalmente de magnetita, mediante la unión carbodiimida entre los grupos OH y los carboxilos del AF, obteniéndose en células HeLa tras 24 h de internalización y a partir de una concentración de 20  $\mu\text{g Fe/ml}$  una concentración final por célula de 1.5 pg/célula [117].

Finalmente la resonancia magnética de imagen también se ha utilizado para evaluar la internalización del coloide CoFe-25°C-AF en las células HeLa vs células A549 (sin folatos sobreexpresados en la superficie) para confirmar la especificidad de las NPs recubiertas de AF hacia células que sobreexpresan folatos. La cuantificación en este caso se realizó de forma cualitativa comparando las imágenes ponderadas en T2 para misma concentración y tiempo de incubación ensayado. La resonancia magnética de imagen del phantom ponderada en T2, de las muestras *in vitro* de las células A549, no presentan cambios aparentes de contraste con respecto al control, Figura 72 (La misma respuesta se obtiene cuando las células A549 se incuban con CoFe-25°C-AC, dato no mostrado). Comparando las medidas de imagen de las células HeLa con CoFe-25°C-AF (Figura 68) y A549 con CoFe-25°C-AF (Figura 72) es evidente que el contraste se muestra más negativo para las células HeLa que para las células A549. Estos resultados confirman que hay una absorción preferencial de las NPs conjugadas con AF por células que sobreexpresan receptores de

folatos. Similares resultados de especificidad han sido publicados en magnetita funcionalizada con AF y marcadores fluorescentes para líneas celulares que sobreexpresan receptores de folatos (HeLa) y sin ellos (línea celular L929)[118].



*Figura 72. Células A549 incubadas durante 24 h con 0.05 mg/ml del coloide CoFe-25°C-AF.*

Resulta por tanto, que la ferrita de cobalto estequiométrica funcionalizada con ácido fólico (CoFe-25°C-AF) es un agente de contraste tipo T2, con un elevado valor de relajatividad ( $479 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) y que es capaz de internalizar en líneas celulares con receptores de folatos en su superficie más eficientemente que las NPs con cubierta de AC.

## 4.9 Hipertermia Magnética

Se realizaron ensayos de hipertermia para las muestras estequiométricas CoFe-25°C-AC y CoFe-60°C-AC. El tamaño de partícula de ambas muestras medido por TEM es de 18 nm y 32 nm respectivamente.

El tipo de comportamiento magnético que presenta un material frente a un campo magnético va a depender principalmente de la magnitud del campo aplicado y del tiempo de medida, es decir, está muy relacionado con la forma en que se miden sus propiedades magnéticas. Así por ejemplo, en el caso de medir la magnetización frente a un campo magnético alterno de un coloide, que el material se comporte como superparamagnético o ferromagnético va a depender de la relación entre el tiempo de medida experimental ( $\tau_M$ ) relacionado con la frecuencia y el tiempo de relajación del sistema coloidal ( $\tau_R$ ). En el caso de la medida de los ciclos de histéresis en AC (también en DC), si el  $\tau_M \gg \tau_R$  no se observará histéresis y el régimen será superparamagnético [119], ya que los momentos magnéticos se relajan tan rápidamente durante la medida que se observa el promedio y el sistema no presenta ciclo de histéresis. En cambio si  $\tau_M \ll \tau_R$  los momentos magnéticos no relajan tan rápido y se encuentran más o menos alineados con el campo aplicado según se realiza la medida produciendo una apertura del ciclo. La relación de las pérdidas por ciclo con el campo magnético (H) son en un ferromagnético del tipo  $H^3$  o superiores [120], en la zona de transición entre el comportamiento superparamagnético y ferromagnético la relación con el campo magnético es del orden  $H^{2.3}$ . Esto ocurre para una distribución de tamaños que cubra las NPs de menor tamaño que presentan pérdidas por relajación (Néel y/o Brown) y también una fracción mayor de NPs que presenten pérdidas de histéresis.

En la Figura 73, se muestra la gráfica que se obtiene al aplicar sobre un coloide un campo magnético alterno ( $\mu_0 H_{AC}$ ) a una determinada frecuencia ( $f$ ), en el ejemplo mostrado los parámetros de ensayo fueron 34 mT y 88 kHz y el coloide de CoFe-60°C-AC. La gráfica describe el aumento de temperatura ( $T_f$ ) que sufre el coloide en función del tiempo de ensayo. Consta de una primera región donde se deja estabilizar el coloide ya situado dentro del equipo de hipertermia durante 100 s, tras este tiempo se aplica el campo magnético durante otros 100 s, tras los cuales se elimina el campo aplicado y se registra el incremento de temperatura en la región estable y lineal. Una vez obtenido el incremento de temperatura, (en el ejemplo mostrado es de 5 °C), se calcula el SAR mediante la ecuación (4.12);

$$SAR = \frac{\sum_i C_{pi} * m_i}{m_{NPs}} * \frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{W}{g} \quad (4.12)$$



dónde;

$$\sum_i C_{pi} \cdot m_i = C_{p(agua)} \cdot m_{agua} + C_{p(NPs)} \cdot m_{NPs} + C_{p(porta)} \cdot m_{porta} = 4.186 \frac{J}{^{\circ}Cg} \cdot 1g + 0.67 \frac{J}{^{\circ}Cg} \cdot m_{NPs} + 0.72 \frac{J}{^{\circ}Cg} \cdot 0.62g$$

de modo que la capacidad calorífica del coloide depende de su concentración. La concentración utilizada en los ensayos del coloide CoFe-60°C-AC, fue de  $m_{NPs} = 4,7 \text{ mg/ml}$ , con  $C_p$  de  $4,63 \text{ J/}^{\circ}\text{C}\cdot\text{g}$ . La concentración utilizada para los ensayos del coloide CoFe-25°C-AC fue de  $4,38 \text{ mg/ml}$  de forma que también  $C_p = 4,63 \text{ J/}^{\circ}\text{C}\cdot\text{g}$ . Los ensayos se realizaron con campos magnéticos alternos entre 0 y 90 mT (no en todos los casos) y frecuencias entre 32 y 101 kHz para ambas muestras.

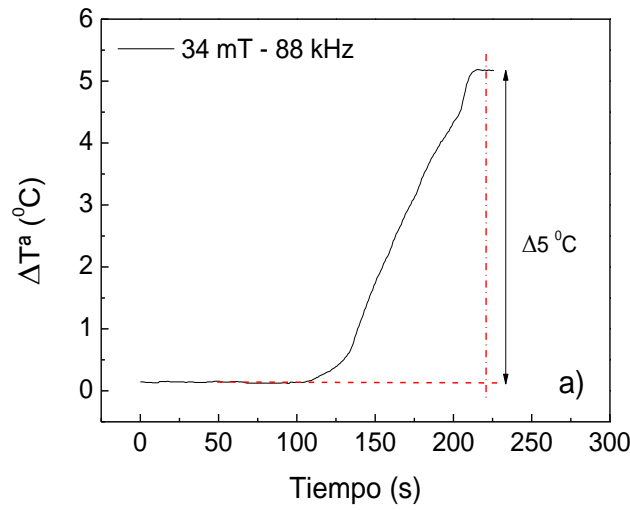


Figura 73. a) Incremento de la  $T$  vs tiempo del coloide CoFe-60°C-AC para  $\mu_0 H_{AC}$  de 34 mT y  $f$  de 88 kHz.

Los valores del SAR obtenidos para el coloide de las nanopartículas de CoFe-25°C-AC en función de la frecuencia y amplitud de campo magnético aplicado se muestran en la Figura 74.

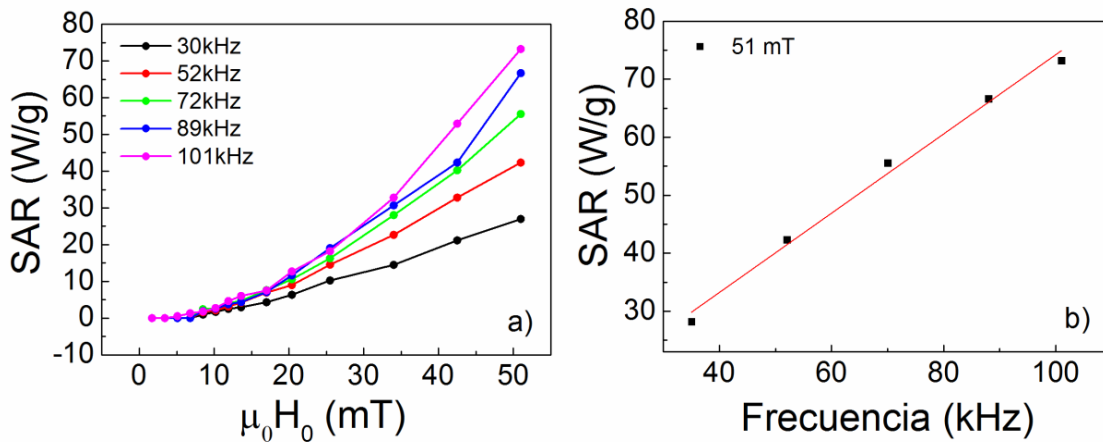


Figura 74. Dependencia del SAR con, a) la amplitud del campo magnético, b) la frecuencia, para el coloide de la muestra CoFe-25°C-AC. Medidos a 25°C.

La respuesta del SAR con el campo magnético aplicado ( $\text{SAR vs } H^n$ ) es exponencial, tomando  $n$  valores desde 1.61 para la frecuencia menor estudiada, 35 kHz, hasta 1.97 para 101 kHz (Tabla 16). En cambio la dependencia del SAR con la frecuencia es lineal en el rango ensayado. Los valores de SAR obtenidos para la muestra de tamaño mayor se muestran en la Figura 75.

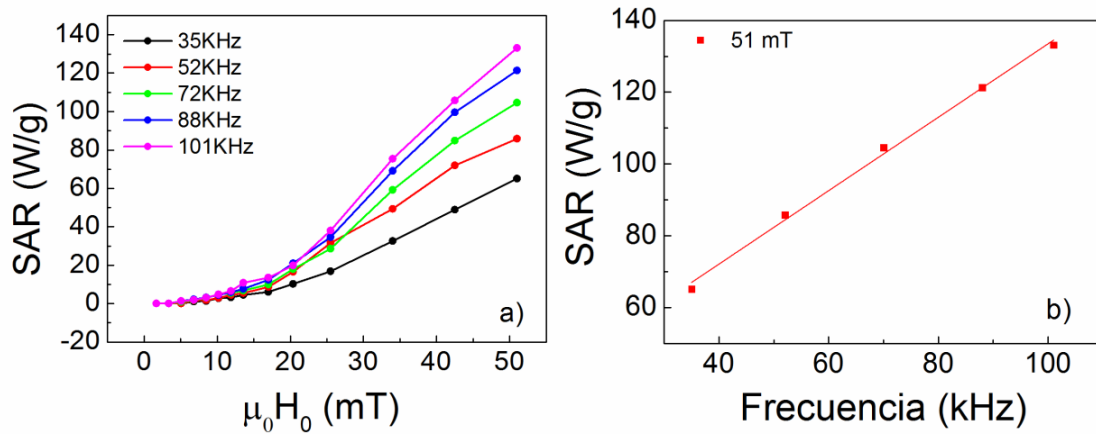


Figura 75. Dependencia del SAR con, a) la amplitud del campo magnético, b) la frecuencia, para el coloide de la muestra CoFe-60°C-AC. Medidos a 25°C.

Los valores de SAR del coloide CoFe-60°C-AC son superiores a los de la muestra pequeña (CoFe-25°C-AC) en todas las frecuencias analizadas. El valor de la relación del SAR con el campo aplicado es también superior obteniéndose valores de  $\text{SAR vs } H^n$  en los que  $n$  varía desde 2.26 hasta 2.40, (Tabla 16).

Tabla 16. Exponente obtenido del ajuste del  $\text{SAR vs } H^n$  de las medidas representadas en las figuras 79 a) y 80 a).

frecuencia / kHz	n / ( $\text{SAR vs } H^n$ )	
	CoFe-25°C-AC	CoFe-60°C-AC
32	1.61	2.26
52	1.68	2.32
72	1.80	2.38
88	1.94	2.37
101	1.97	2.40

Otro modo de medir el SAR, sería a partir del área de los ciclos de histéresis registrados en las mismas condiciones de campo magnético alterno de frecuencia  $f$  y amplitud  $\mu_0 H_{\max}$  y puede expresarse como,  $\text{SAR} = A \cdot f$ . El área ( $A$ ) va a depender principalmente de la anisotropía ( $K$ ) de las NPs, del volumen hidrodinámico, de la temperatura, de la frecuencia y amplitud del campo magnético y eventualmente de las interacciones magnéticas entre las NPs[121].

La relación entre el SAR obtenido de las medidas de incremento de temperatura en función del tiempo y el área del ciclo de histéresis obtenido bajo los mismos parámetros de frecuencia y

campo magnético se ha comprobado para la muestra CoFe-60°C-AC a la frecuencia de 52 kHz (Figura 76). Se adjunta a modo de comparativa el ciclo de histéresis en DC.

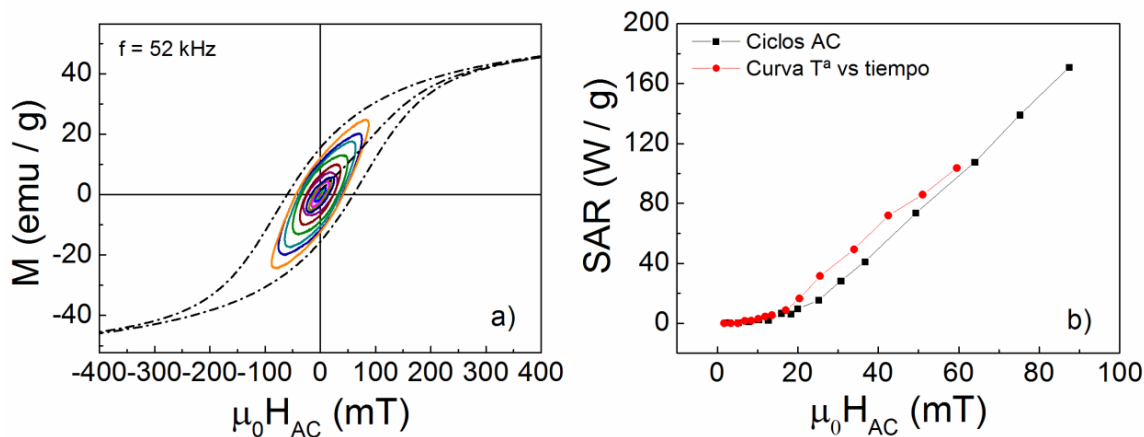


Figura 76. a) Ciclos de histéresis obtenidos aplicando diferentes campos magnéticos AC a  $f = 52$  kHz. En línea discontinua ciclo de histéresis en DC. b) Comparativa del SAR obtenido a través de la integración del área de los ciclos AC y el obtenido de las medidas de  $T$  vs  $t$ . Para la muestra CoFe-60°C-AC. Realizados a 25°C.

La Figura 76b, muestra los valores del SAR deducidos de la integración de los ciclos de histéresis que se muestran en la Figura 76a y los valores de SAR deducidos de las medidas de incremento de temperatura. La buena correlación entre ambos valida la calidad del equipo utilizado y el método de cálculo[120, 122], (medidas realizadas durante la estancia en el LPCNO de Toulouse).

El aumento de área del ciclo de histéresis  $M$ - $\mu_0 H_{AC}$  en AC, para un mismo campo aplicado, en este caso variando la frecuencia se muestra en la Figura 77, como era de esperar a mayor frecuencia aplicada mayor SAR, tal y como predice la ecuación  $SAR = A \cdot f$ .

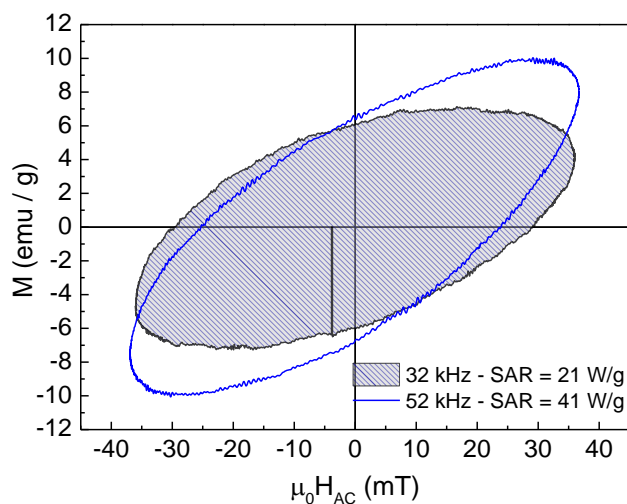


Figura 77. Ciclos de histéresis para  $f$  de 32 kHz y 52 kHz y  $\mu_0 H_{AC}$  de 36 mT del coloide CoFe-60°C-AC, a 25°C.

Una vez calculado el valor del SAR se procedió a realizar una estimación, numérica y experimental, del tipo de mecanismo por el que se produce la relajación magnética del sistema. Como se ha reflejado en líneas anteriores el valor del SAR está fuertemente influenciado por la anisotropía del material, el volumen hidrodinámico y la frecuencia de ensayo, entre otros motivos. De modo que el cálculo de la anisotropía de la ferrita de cobalto, va a facilitar la comprensión del tipo de mecanismo de relajación que está teniendo lugar en las medidas de hipertermia. Este valor puede ser estimado para un conjunto de nanopartículas orientadas al azar a la temperatura de 5 K, ecuación (4.13) a partir de los ciclos de histéresis en DC[123]:

$$H_c = 0.96 \frac{K}{M_s} \left[ 1 - \left( \frac{T}{T_B} \right)^{0.77} \right] \cong 0.96 \frac{K}{M_s} \quad (4.13)$$

Como la temperatura de bloqueo se estima muy superior a 300 K (Figura 41) el termino  $T/T_B \approx 0$ , y la ecuación por tanto queda reducida según se indica en (4.13). En la Tabla 17, se muestran los valores de anisotropía, así como algunos de los parámetros magnéticos obtenidos de los ciclos de histéresis a 5 K en DC, como  $H_c$  y la magnetización de saturación calculada con la regresión lineal de la inversa del campo magnético vs  $M$  en la zona de máxima saturación.

Tabla 17. Parámetros magnéticos medidos a 5 K.

	$M_s$ (kA/m)	$K$ (J/m <sup>3</sup> )	$H_c$ (T)	$H_k$ (T)
<b>CoFe-25°C-AC</b>	458	$3.10 \cdot 10^5$	0.650	1.3
<b>CoFe-60°C-AC</b>	470	$3.11 \cdot 10^5$	0.636	1.3

Los valores de anisotropía obtenidos utilizando la ecuación (4.13) son semejantes a los valores descritos en la literatura para ferritas de cobalto sintetizadas por otros métodos de tamaño también nanométrico, que oscilan entre  $1,4 \cdot 10^5$  J/m<sup>3</sup> [11] y  $5,7 \cdot 10^5$  J/m<sup>3</sup>[123]. Las pequeñas diferencias entre los resultados obtenidos y entre los descritos en la literatura pueden provenir de la diferente estequiometría, del orden de inversión de la espinela o de posibles tratamientos térmicos de las ferritas [11, 59]. En cambio la diferencia de anisotropía de las nanopartículas con respecto al material másico ( $K = 2 \cdot 10^5$  J/m<sup>3</sup>) es coherente debido a la posible contribución de la anisotropía de superficie, gracias a la menor relación superficie volumen [124].

El valor de campo de anisotropía (recogido en la Tabla 17) se obtiene a partir de la ecuación  $H_K = \frac{2K}{M_s}$ , para calcular  $H_k$  el valor de  $M_s$  se introduce en A/m (resultado del producto de la magnetización de saturación en Am<sup>2</sup>/kg = emu/g y la densidad de la ferrita ( $\rho$ ), de 5280 kg/m<sup>3</sup>). Este valor también se puede estimar gráficamente, en el punto en el cual la diferencia de  $M$  entre la rama

de magnetización y desmagnetización presente el 3% de diferencia del  $M_s$  [125]. Gráficamente este punto se ha podido estimar en torno a  $\approx 1.8$  T.

La condición más apropiada para que un material presente un ciclo de histéresis típicamente ferromagnético/ferrimagnético saturado y que por tanto disipe más calor es que el campo aplicado  $H_{AC} \geq 0.5H_K$ . Desafortunadamente este valor queda muy alejado del campo máximo que se ha podido aplicar ( $\mu_0 H_{AC}$ ) en las medidas de hipertermia (0,090 T), ya que el valor de  $H_K$  determinado es de 1.3 T se necesitaría un valor cercano a  $\approx 0.65$  T ( $H_{AC} \geq 0.5H_K$ ) para obtener el máximo calor de disipación.

Pese a ello, es evidente que el coloide responde a la acción del  $\mu_0 H_{AC}$  disipando calor. Los mecanismos mediante los cuales un coloide de NPs monodominio disipa calor bajo la aplicación de campos magnéticos y frecuencias adecuadas para poder ser utilizados en hipertermia se dividen en dos, a la rotación de las NPs en el fluido (Brown) y/o a la inversión de la magnetización de los momentos de cada NP (Néel). Para que esta disipación de calor sea lo más eficiente a nivel celular el mecanismo más rápido y por tanto el predominante ha de ser el de Néel. Este se relaciona exponencialmente con la anisotropía y el volumen magnético del material,  $\tau_N = \tau_0 e^{(KV/K_B T)}$ .

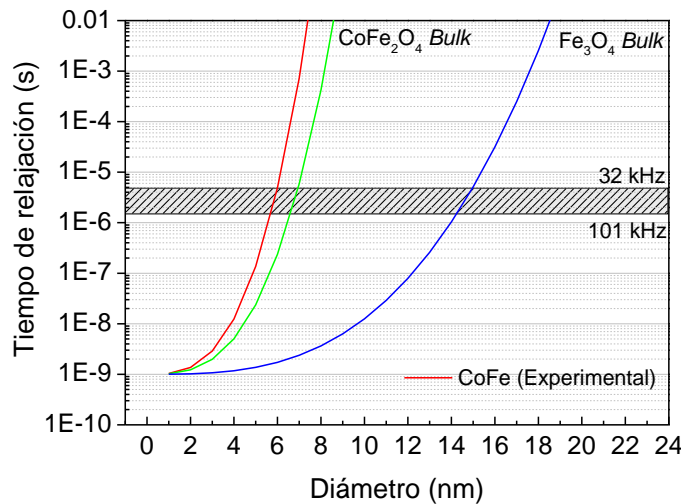


Figura 78. Tiempos de relajación de Néel calculados para la ferrita de cobalto experimental y la magnetita y ferrita de cobalto bulk. En gris rango de frecuencias ensayado (equivalente a  $\tau_M$ ).

En la Figura 78, se muestra los tiempos de relajación de Néel obtenidos utilizando la ecuación  $\tau_N = \tau_0 e^{KV/K_B T}$  para la ferrita de cobalto bulk ( $K = 2.10^5$  J/m<sup>3</sup>), la magnetita bulk ( $K = 2.10^4$  J/m<sup>3</sup>) y las ferritas experimentales, en función del diámetro de partícula. En este caso, al ser el valor de anisotropía de ambas ferritas experimentales muy similar, el tiempo de relajación de Néel de ambas es el mismo.

La producción de energía térmica mediante el mecanismo de relajación de Néel requiere que la energía de anisotropía magnética de la NP sea superior a la energía térmica de la misma ( $KV > K_B T$ ) [126]. La anisotropía magnética por tanto va a tener un efecto determinante en el tiempo de relajación de las NPs, como muestra la Figura 78, un mínimo aumento en la anisotropía da lugar a un aumento exponencial de los tiempos de relajación y por tanto una disminución del SAR, para un diámetro de partícula dado. El recuadro gris muestra los tiempos de medida que se han utilizado, que corresponden a  $\tau_M = \frac{1}{2\pi f}$ . Cuando el tiempo de relajación de Néel se encuentre dentro de este intervalo estará cerca de la resonancia ( $2\pi f \cdot \tau_r = 1$ ) y se alcanzará el máximo SAR. Según la Figura 78, la contribución de Néel para dicha anisotropía hubiera sido óptima para un rango de tamaño de partícula de  $\approx 5.5$  nm para las frecuencias ensayadas. O bien, la anisotropía de la muestra CoFe-25°C-AC de 18.3 nm de tamaño magnético debería haber tenido el valor de  $K = 1,1 \cdot 10^4$  J/m<sup>3</sup> en la frecuencia de 32 kHz y de  $K = 9,5 \cdot 10^3$  J/m<sup>3</sup> en la frecuencia de 101 kHz para que la muestra aportará el calor máximo relajando mediante el mecanismo de Néel. En cambio los valores de  $\tau_N$  para las muestras ensayadas son muy superiores a uno ( $\tau_N \gg \tau_M$ ).

En cuanto al mecanismo de relajación browniano, ocurrirá cuando la anisotropía magnética del material sea lo suficientemente fuerte para sobreponerse a la resistencia por viscosidad. Si esto se cumple, el campo magnético aplicado puede provocar la rotación de la NP por si misma dentro del ferrofluido, mientras el momento magnético permanece fijo a lo largo de los ejes del cristal. Este mecanismo es linealmente dependiente del volumen hidrodinámico y de la viscosidad del medio, como refleja la ecuación,  $\tau_B = \frac{3\eta V_H}{K_B T}$ .

En la Figura 79, se muestran los tiempos de relajación browniano para NPs en tres medios con diferente viscosidad en función del diámetro de NPs. El medio más viscoso (etilenglicol) reducirá la facilidad de las NPs para rotar y por tanto el tiempo de relajación será mayor, mientras que el efecto es el contrario en medio menos viscoso. Se observa también cómo el efecto del volumen en la relajación browniana no es tan acusado como en la relajación de Néel, ya que en este último caso la relación es exponencial.

La línea de color negro describe los tiempos de relajación para un ferrofluido en agua a 25 °C, las estrellas rojas y negras sobre esta línea sitúan los tamaños hidrodinámicos de los ferrofluidos de CoFe-25°C-AC (verde) y CoFe-60°C-AC (rojo). En gris se observan los tiempos de medida utilizados para realizar los ensayos de hipertermia. Los tiempos de relajación de Brown de la ferrita de cobalto CoFe-25°C-AC fueron de  $\tau_B = 8,04 \cdot 10^{-5}$  s y los de CoFe-60°C-AC de  $\tau_B = 1,97 \cdot 10^{-3}$  s.

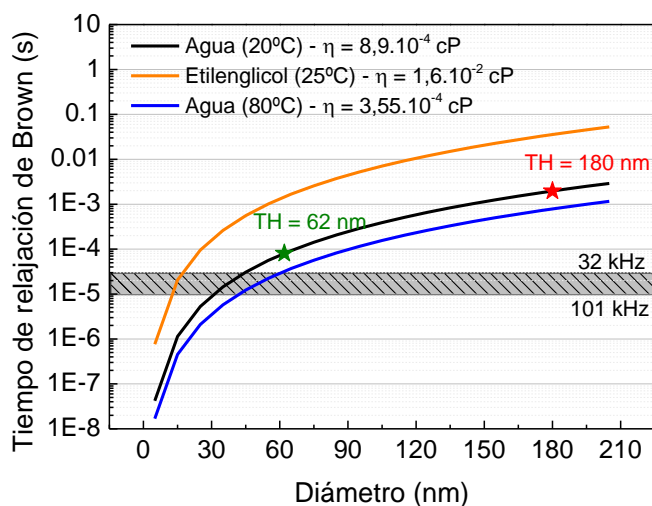


Figura 79. Tiempo de relajación de Brown en función de la viscosidad del medio y del tamaño de NP. Los símbolos estrella verde y roja corresponden al TH de la ferrita de cobalto CoFe-25°C-AC y CoFe-60°C-AC. En gris la zona correspondiente a los tiempos de medida utilizados en los experimentos de hipertermia.

Estudios previos ya han demostrado el efecto de la viscosidad en coloides de ferrita de cobalto de 9.7 nm y PDI (0.35) [127], obteniéndose una reducción del SAR desde 420 W/g a 90 W/g con el aumento de la viscosidad de  $0,75 \cdot 10^{-3}$  cP a 0.335 cP, debido a la menor facilidad que presenta las NP para rotar físicamente en el medio. En cambio cuando el mecanismo de Brown no es predominante, el SAR no se ve alterado con el aumento de viscosidad [127]. Otros autores han publicado cómo el mecanismo de Brown es el predominante para NPs de ferrita de cobalto o NPs con anisotropía similar [128, 129].

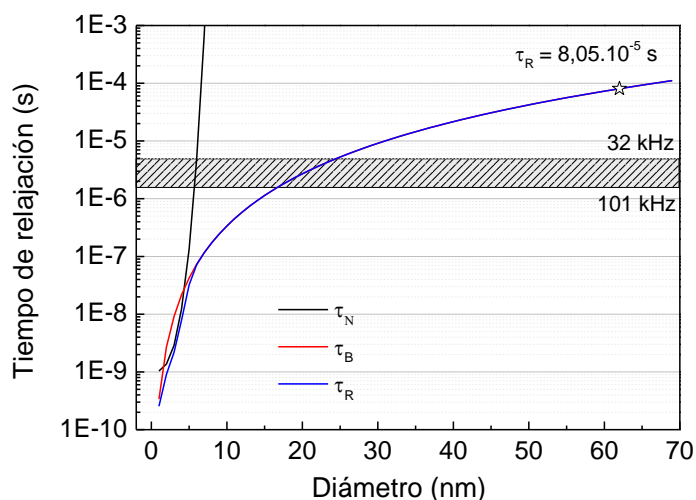


Figura 80. Comparativa de los tiempos de relajación de Néel y Brown calculados para la ferrita de cobalto CoFe-25°C-AC con anisotropía  $3,10 \cdot 10^5$  J/m<sup>3</sup> y  $\eta = 0,89 \cdot 10^4$  Cp. En el recuadro gris los tiempos de medida.

En la Figura 80, se comparan los tiempos de relajación de ambos mecanismos, asumiendo que el volumen magnético de las partículas es similar a su volumen hidrodinámico. Los datos han sido calculados para la ferrita de cobalto de CoFe-25°C-AC con anisotropía  $3,10 \cdot 10^5 \text{ J/m}^3$  y  $\eta = 0,89 \cdot 10^4 \text{ Cp}$ .

Se observa que para la ferrita de cobalto de tamaño TEM de 18 nm dispersa en agua, el mecanismo predominante es de Brown, ya que la relajación de Néel podría producirse exclusivamente en tamaños de partículas inferiores a 5 nm. La línea azul muestra el tiempo de relajación total en función del tamaño calculado mediante la ecuación  $\tau_R = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_B + \tau_N}$ . Al ser la dependencia del tiempo de relajación de Néel exponencial con la anisotropía del material, se obtienen tiempos de relajación extremadamente elevados, por tanto la contribución de Néel es prácticamente descartable y el tiempo de relajación solapa perfectamente con el tiempo característico de la rotación Brown. La misma conclusión se obtiene para la muestra CoFe-60°C-AC, Figura 81, donde el tiempo de relajación de Brown es el que prevalece.

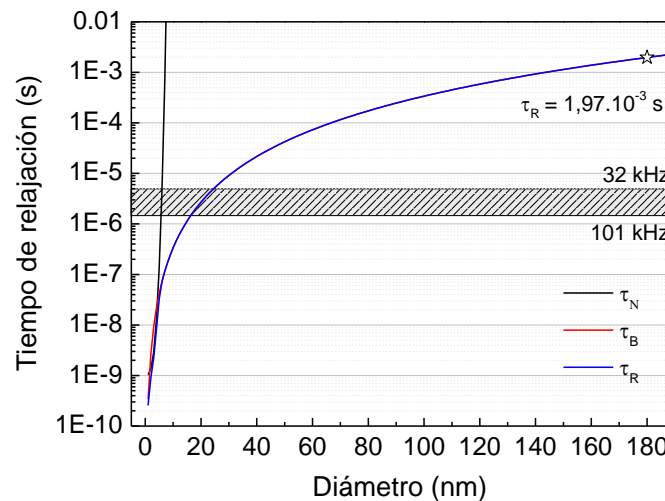


Figura 81. Comparativa de los tiempos de relajación de Néel y Brown calculados para la ferrita de cobalto CoFe-60°C-AC con anisotropía  $3,11 \cdot 10^5 \text{ J/m}^3$  y  $\eta = 0,89 \cdot 10^4 \text{ Cp}$ .

Para comprobar experimentalmente estas hipótesis se han realizado medidas de calentamiento para ambas ferritas a 110 kHz y 20 mT en agar, donde las partículas se encuentran inmovilizadas para rotar. El valor obtenido en medio acuoso fue de 12.7 W/g y 22.4 W/g para CoFe-25°C-AC y CoFe-60°C-AC respectivamente, mientras que en agar el valor del SAR fue cero en ambas muestras, certificando de este modo que el calor disipado por las ferritas de cobalto de la presente tesis es debido a la rotación física de la partícula en el interior del fluido.



Que el mecanismo de relajación de Brown predomine en estas nanopartículas puede provocar que la capacidad de calentamiento de la ferrita de cobalto en medio intracelular sea prácticamente nula, ya que van a existir interacciones viscosas, interacciones magnéticas entre nanopartículas y/o estéricas que van a aumentar el tiempo de relajación browniano y por tanto van a disminuir el SAR intracelular [128].

La relajación de Brown se refiere a la rotación de la partícula magnética en su conjunto debido al torque ejercido por el campo magnético AC sobre el momento magnético. La presencia de histéresis en las medidas AC, cuando la componente de Brown es la predominante en los tiempos de relajación será por tanto debida a la rotación del eje de fácil imanación donde la dirección de los momentos permanezca fija dentro del cristal, de modo que se genera calor incluso estando alejados de ( $H_{AC} \geq 0.5H_K$ ). Usov y col. [130] realizaron cálculos numéricos de NPs magnéticas que disipen calor exclusivamente por el “modelo viscoso”. Según este modelo, el área del ciclo de histéresis obtenida para NPs de tamaños comprendidos en el rango entre 16 y 60 nm, (medido a la misma frecuencia y campo) es cada vez mayor según se aumenta el tamaño de las NPs, debido a que el efecto de las fluctuaciones térmicas en la dinámica del vector de magnetización decrece.

Aunque no se haya estudiado el efecto de la polidispersidad (PDI) de tamaño de partícula en la presente tesis, esta descrito que su influencia en el SAR es de vital importancia, Fortin y col. relacionaron el PDI de un coloide de ferrita de cobalto de 12 nm de tamaño de partícula con la obtención de diferentes valores de SAR. Por ejemplo, la reducción del SAR de 430 W/g a 340 W/g está relacionada con el aumento del PDI de 0.2 a 0.4 (para 24.8 kA/m de  $\mu_0 H_{AC}$  y  $f = 700$  kHz) [127].

Según la ecuación que describe el proceso de calentamiento de un ferrofluido en presencia de un campo magnético, cuanto mayor sea éste mayores valores de SAR se obtendrán, pero existe una limitación médica y fisiológica cuando se trata de utilizar las NPs en fase clínica. La aplicación de campos magnéticos y frecuencias elevadas va a favorecer la inducción de calor no deseado sobre tejidos tanto sanos como cancerígenos debido a la generación de corrientes de Eddy, reduciendo en este sentido la especificidad de la terapia. Brezovich y col. [131], limitaron el producto de  $H_{AC} \cdot f$  realizando un estudio en pacientes reales, donde quedó demostrado que eran capaces de sentir sensación de calor y llegar a soportar durante al menos una hora el tratamiento sin sentir malestar cuando el producto de  $\mu_0 H_{AC} \cdot f$  se encontraba en valores inferiores a  $4.85 \cdot 10^8$  A/ms, un valor menos restrictivo fue propuesto por Hergt y col. de  $5 \cdot 10^9$  A/ms [126, 132].

El número de publicaciones a cerca de la hipertermia magnética con NPs crece exponencialmente cada año, aunque principalmente los trabajos realizados se centran en los óxidos de hierro del tipo magnetita o maghemita, son más escasos los artículos referidos a las nanopartículas de ferrita de cobalto. Desafortunadamente, la lista tan extensa de valores de SAR

presentes en la literatura es difícil de relacionar ya que el SAR depende de parámetros extrínsecos como la frecuencia y el campo magnético aplicado. Esto hace dificultosa la comparativa y el consenso sobre cuál es el mejor material y las mejores condiciones para un tratamiento eficiente. Recientemente, se ha desarrollado un parámetro denominado (ILP) “*intrinsic loss power*” definido como  $ILP = SAR/fH_0^2$  [133]. En la Tabla 18 se recogen los valores de ILP más destacables de la bibliografía existente hasta la fecha de nanopartículas de ferrita de cobalto, donde se puede apreciar que los valores de ILP obtenidos en la presente tesis se encuentran en un rango intermedio con respecto a los publicados.

Tabla 18. Resumen bibliográfico de los valores de SAR, características magnéticas y condiciones de campo y frecuencia aplicados para ferritas de cobalto.

	D(nm)	$M_s$ (A/m)	$K$ (J/m <sup>3</sup> )	$f$ (kHz)	$\mu_0 H_{Ac}$ (kA/m)	SAR (W/g)	ILP nHm <sup>2</sup> Kg <sup>-1</sup>	Mecanismo
[134]	9.2	3.2e5	9.2e4	900	22	350	0.80	Brown y Néel
[123]	8.4	4.6e5	7.3e5	183	12	29.3	1.11	Brown y Néel
[129]	13	3.32e5	-----	828	15.9	170	0.81	Brown
[127]	9.1	3.2e5	1.2e5	700	24.8	360	0.84	Brown
[135]	5.2	3.54e5	-----	111	3	0.6	0.6	-----
[136]	12.9	2.53e5	2.6e5	500	5.4	0.07	0.0048	-----
[137]				117	51.4	420	1.35	
[138]	17	2.54e5	-----	275	18.31	805	8.73	-----
[139]	18.8	3.59e5	-----	400	24.12	90.2	0.38	-----
[140]	6.1	4.11e5	-----	95	19.9	30	0.8	-----
[141]	170	3.8e5	-----	6770	0.11	30.36		-----
[142]	18 <sup>a</sup>	3.22e5	-----	108	63.6	122.4	0.28	Néel
[143]	4	2.53e5	-----	276	66.6	35.24	0.028	-----
[144]	10	3.14e5	1.8e5	300	15	37	0.55	-----
[145]	12.7	3.7e5	2.5e5	260	25.4	98.51	0.59	-----
[146]	10.2	2.72e5	3.7e4	500	21.2	0.6	0.0027	-----
	18	4.58e5	3.10e5	101	40	73	0.45	Brown
	32	4.70e5	3.11e5	101	40	133	0.82	Brown

## Referencias

- [1] Cabrera, L.;Gutierrez, S.;Menendez, N.;Morales, M. P.; Herrasti, P. Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochimica Acta*. **2008**, *53*, 3436-3441.
- [2] Mazario, E.;Morales, M. P.;Galindo, R.;Herrasti, P.; Menendez, N. Influence of the temperature in the electrochemical synthesis of cobalt ferrites nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*. **2012**, *536, Supplement 1*, S222-S225.
- [3] Ajroudi, L.;Mliki, N.;Bessais, L.;Madigou, V.;Villain, S.; Leroux, C. Magnetic, electric and thermal properties of cobalt ferrite nanoparticles. *Materials Research Bulletin*. **2014**, *59*, 49-58.
- [4] Carvajal, J. FULLPROF: A program for rietveld refinement and pattern matching analysis. *Abstracts of the Satellite Meeting on Powder Diffraction of the XV Congress of the IUCr*. **1990**, citeulike-article-id:1840305.
- [5] Cornell, R. M.; Schwertmann, U. Transformations. In *The Iron Oxides*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004; pp 365-407.
- [6] Gallagher, K. J.;Feitknecht, W.; Mannweiler, U. Mechanism of oxidation of magnetite to  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . *Nature*. **1968**, *217*, 1118-1121.
- [7] Ennas, G.;Marongiu, G.;Musinu, A.;Falqui, A.;Ballirano, P.; Caminiti, R. Characterization of nanocrystalline  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  prepared by wet chemical method. *Journal of Materials Research*. **1999**, *14*, 1570-1575.
- [8] Stoner, E. C.; Wohlfarth, E. P. A mechanism of magnetic hysteresis in heterogeneous alloys. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*. **1948**, *240*, 599-642.
- [9] Greenwood, N. Mossbauer spectroscopy.
- [10] Moumen, N.;Bonville, P.; Pileni, M. P. Control of the size of cobalt ferrite magnetic fluids: Mössbauer spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry*. **1996**, *100*, 14410-14416.
- [11] Rajendran, M.;Pullar, R. C.;Bhattacharya, A. K.;Das, D.;Chintalapudi, S. N.; Majumdar, C. K. Magnetic properties of nanocrystalline  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  powders prepared at room temperature: variation with crystallite size. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2001**, *232*, 71-83.
- [12] Mazario, E.;Herrasti, P.;Morales, M. P.; Menendez, N. Synthesis and characterization of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ferrite nanoparticles obtained by an electrochemical method. *Nanotechnology*. **2012**, *23*, 355708.
- [13] Vučinić-Vasić, M.;Antic, B.;Kremenović, A.;Nikolic, A. S.;Stoiljkovic, M.;Bibic, N.;Spasojevic, V.; Colomban, P. Zn,Ni ferrite/ $\text{NiO}$  nanocomposite powder obtained from acetylacetonato complexes. *Nanotechnology*. **2006**, *17*, 4877.

- [14] O'handley, R. C. *Modern magnetic materials: principles and applications*; Wiley New York, 2000.
- [15] Brabers, V. A. M. Chapter 3 Progress in spinel ferrite research. In *Handbook of Magnetic Materials*. K. H. J. Buschow, Ed.; Elsevier, 1995; pp 189-324.
- [16] Cullity, B. D.; Graham, C. D. In *Introduction to magnetic materials*. John Wiley & Sons, Inc., 2008; pp 537-544.
- [17] Luna, C.; Morales, M. a. d. P.; Serna, C. J.; Vázquez, M. Multidomain to single-domain transition for uniform  $\text{Co}_{80}\text{Ni}_{20}$  nanoparticles. *Nanotechnology*. **2003**, *14*, 268.
- [18] Vázquez-Vázquez, C.; López-Quintela, M. A.; Buján-Núñez, M. C.; Rivas, J. Finite size and surface effects on the magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles. *J Nanopart Res*. **2011**, *13*, 1663-1676.
- [19] Kim, Y. I.; Kim, D.; Lee, C. S. Synthesis and characterization of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  magnetic nanoparticles prepared by temperature-controlled coprecipitation method. *Physica B: Condensed Matter*. **2003**, *337*, 42-51.
- [20] Gyergyek, S.; Makovec, D.; Kodre, A.; Arčon, I.; Jagodič, M.; Drofenik, M. Influence of synthesis method on structural and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles. *J Nanopart Res*. **2010**, *12*, 1263-1273.
- [21] Zi, Z.; Sun, Y.; Zhu, X.; Yang, Z.; Dai, J.; Song, W. Synthesis and magnetic properties of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ferrite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2009**, *321*, 1251-1255.
- [22] Chinnasamy, C. N.; Jeyadevan, B.; Perales-Perez, O.; Shinoda, K.; Tohji, K.; Kasuya, A. Growth dominant co-precipitation process to achieve high coercivity at room temperature in  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles. *Magnetics, IEEE Transactions on*. **2002**, *38*, 2640-2642.
- [23] Franco, A.; e Silva, F. C. High temperature magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles. *Applied Physics Letters*. **2010**, *96*, -.
- [24] Blanco-Gutiérrez, V.; Gallastegui, J. A.; Bonville, P.; Torralvo-Fernandez, M. J.; Saez-Puche, R.  $\text{MFeO}$  (M: Co, Ni) nanoparticles: Mössbauer and X-ray absorption spectroscopies studies and high-temperature superparamagnetic behavior. *Journal of physical chemistry. C*. **2012**, *116*, 24331-24339.
- [25] Peddis, D.; Yaacoub, N.; Ferretti, M.; Martinelli, A.; Piccaluga, G.; Musinu, A.; Cannas, C.; Navarra, G.; Greneche, J. M.; Fiorani, D. Cationic distribution and spin canting in  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles. *Journal of Physics: Condensed Matter*. **2011**, *23*, 426004.
- [26] Chen, J. P.; Sorensen, C. M.; Klabunde, K. J.; Hadjipanayis, G. C.; Devlin, E.; Kostikas, A. Size-dependent magnetic properties of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  fine particles synthesized by coprecipitation. *Physical Review B*. **1996**, *54*, 9288-9296.
- [27] Coey, J. M. D. Noncollinear spin arrangement in ultrafine ferrimagnetic crystallites. *Physical Review Letters*. **1971**, *27*, 1140-1142.

- [28] Berkowitz, A. E.; Walter, J. L. Amorphous particles produced by spark erosion. *Materials Science and Engineering*. **1982**, *55*, 275-287.
- [29] Gopalan, E. V.; Al-Omari, I. A.; Kumar, D. S.; Yoshida, Y.; Joy, P. A.; Anantharaman, M. R. Inverse magnetocaloric effect in sol-gel derived nanosized cobalt ferrite. *Appl. Phys. A*. **2010**, *99*, 497-503.
- [30] Naughton, B. T.; Clarke, D. R. Lattice expansion and saturation magnetization of Nickel-zinc ferrite nanoparticles prepared by aqueous precipitation. *Journal of the American Ceramic Society*. **2007**, *90*, 3541-3546.
- [31] García-Otero, J.; Porto, M.; Rivas, J.; Bunde, A. Influence of the cubic anisotropy constants on the hysteresis loops of single-domain particles: A Monte Carlo study. *Journal of Applied Physics*. **1999**, *85*, 2287-2292.
- [32] Usov, N. A.; Peschany, S. E. Theoretical hysteresis loops for single-domain particles with cubic anisotropy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **1997**, *174*, 247-260.
- [33] Vestal, C. R.; Zhang, Z. J. Effects of surface coordination chemistry on the magnetic properties of  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  spinel ferrite nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. **2003**, *125*, 9828-9833.
- [34] Mehdaoui, B.; Meffre, A.; Lacroix, L.-M.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Respaud, M.; Gougeon, M.; Chaudret, B. Magnetic anisotropy determination and magnetic hyperthermia properties of small Fe nanoparticles in the superparamagnetic regime. *Journal of Applied Physics*. **2010**, *107*, -.
- [35] Vergés, M. A.; Costo, R.; Roca, A. G.; Marco, J. F.; Goya, G. F.; Serna, C. J.; Morales, M. P. Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain-multidomain limit. *Journal of Physics D: Applied Physics*. **2008**, *41*, 134003.
- [36] Kim, D.-H.; Zeng, H.; Ng, T. C.; Brazel, C. S. T1 and T2 relaxivities of succimer-coated  $\text{MFe}_2^{3+}\text{O}_4$  ( $\text{M}=\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ ) inverse spinel ferrites for potential use as phase-contrast agents in medical MRI. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2009**, *321*, 3899-3904.
- [37] Salas, G.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Morales Mdel, P. Relationship between physico-chemical properties of magnetic fluids and their heating capacity. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*. **2013**, *29*, 768-776.
- [38] Mejías, R.; Costo, R.; Roca, A. G.; Arias, C. F.; Veintemillas-Verdaguer, S.; González-Carreño, T.; del Puerto Morales, M.; Serna, C. J.; Mañes, S.; Barber, D. F. Cytokine adsorption/release on uniform magnetic nanoparticles for localized drug delivery. *Journal of Controlled Release*. **2008**, *130*, 168-174.

- [39] Nigam, S.; Barick, K. C.; Bahadur, D. Development of citrate-stabilized  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **2011**, *323*, 237-243.
- [40] Lan, Q.; Liu, C.; Yang, F.; Liu, S.; Xu, J.; Sun, D. Synthesis of bilayer oleic acid-coated  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles and their application in pH-responsive Pickering emulsions. *J. Colloid. Interf. Sci.* **2007**, *310*, 260-269.
- [41] Rana, S.; Philip, J.; Raj, B. Micelle based synthesis of cobalt ferrite nanoparticles and its characterization using Fourier Transform Infrared Transmission Spectrometry and Thermogravimetry. *Materials Chemistry and Physics.* **2010**, *124*, 264-269.
- [42] Costo, R. Synthesis and characterization of ultrasmall iron oxide magnetic colloids for biomedical applications. Universidad Autonoma de Madrid, Madrid, 2010.
- [43] Waychunas, G. A.; Apter, M. J.; Brown Jr, G. E. X-ray K-edge absorption spectra of Fe minerals and model compounds: near-edge structure. *Physics and Chemistry of Minerals.* **1983**, *10*, 1-9.
- [44] Farges, F. Ab initio and experimental pre-edge investigations of the Mn K-edge XANES in oxide-type materials. *Physical Review B.* **2005**, *71*, 155109.
- [45] Ammar, S.; Helfen, A.; Jouini, N.; Fievet, F.; Rosenman, I.; Villain, F.; Molinie, P.; Danot, M. Magnetic properties of ultrafine cobalt ferrite particles synthesized by hydrolysis in a polyol medium. *Journal of Materials Chemistry.* **2001**, *11*, 186-192.
- [46] Carta, D.; Casula, M. F.; Falqui, A.; Loche, D.; Mountjoy, G.; Sangregorio, C.; Corrias, A. A structural and magnetic investigation of the inversion degree in ferrite nanocrystals  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (M = Mn, Co, Ni). *The Journal of Physical Chemistry C.* **2009**, *113*, 8606-8615.
- [47] Wilke, M.; Farges, F.; Petit, P.-E.; Brown, G. E.; Martin, F. Oxidation state and coordination of Fe in minerals: An Fe K-XANES spectroscopic study. *American Mineralogist.* **2001**, *86*, 714-730.
- [48] Artus, M.; Tahar, L. B.; Herbst, F. d. r.; Smiri, L.; Villain, F. o.; Yaacoub, N.; Grenche, J.-M.; Ammar, S.; Fievet, F. Size-dependent magnetic properties of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles prepared in polyol. *Journal of Physics: Condensed Matter.* **2011**, *23*, 506001.
- [49] Vandenberghe, R.; De Grave, E. Mössbauer effect studies of oxidic spinels. In *Mössbauer Spectroscopy Applied to Inorganic Chemistry*. G. Long; F. Grandjean, Eds.; Springer US, 1989; pp 59-182.
- [50] Watson, R. E.; Freeman, A. J. Origin of effective fields in magnetic materials. *Physical Review.* **1961**, *123*, 2027-2047.
- [51] Goldman, A. Physical, mechanical and thermal aspects of ferrites. *Modern Ferrite Technology.* **2006**, 395-402.
- [52] Keller, H.; Savić, I. M. Mossbauer studies of the static and dynamic critical behavior of the layered antiferromagnets  $\text{RbFeF}_4$  and  $\text{KFeF}_4$ . *Physical Review B.* **1983**, *28*, 2638-2652.

- [53] Sawatzky, G. A.; VAN DER Woude, F.; Morrish, A. H. Cation distributions in octahedral and tetrahedral sites of the ferrimagnetic spinel  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . *Journal of Applied Physics*. **1968**, 39, 1204-1205.
- [54] Sawatzky, G. A.; Van Der Woude, F.; Morrish, A. H. Mössbauer study of several ferrimagnetic spinels. *Physical Review*. **1969**, 187, 747-757.
- [55] Le Trong, H.; Presmanes, L.; De Grave, E.; Barnabé, A.; Bonningue, C.; Tailhades, P. Mössbauer characterisations and magnetic properties of iron cobaltites  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  ( $1 \leq x \leq 2.46$ ) before and after spinodal decomposition. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2013**, 334, 66-73.
- [56] Peddis, D.; Cannas, C.; Piccaluga, G.; Agostinelli, E.; Fiorani, D. Spin-glass-like freezing and enhanced magnetization in ultra-small  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles. *Nanotechnology*. **2010**, 21, 125705.
- [57] Cannas, C.; Musinu, A.; Piccaluga, G.; Fiorani, D.; Peddis, D.; Rasmussen, H. K.; Mørup, S. Magnetic properties of cobalt ferrite-silica nanocomposites prepared by a sol-gel autocombustion technique. *The Journal of Chemical Physics*. **2006**, 125.
- [58] Morrish, A. H. The physical principles of magnetism. *The physical principles of magnetism, by Allan H. Morrish, pp. 696. ISBN 0-7803-6029-X. Wiley-VCH, January 2001. 2001*, 1.
- [59] Melikhov, Y.; Snyder, J. E.; Jiles, D. C.; Ring, A.; Paulsen, J.; Lo, C.; Dennis, K. Temperature dependence of magnetic anisotropy in Mn-substituted cobalt ferrite. *Journal of applied physics*. **2006**, 99, 08R102.
- [60] Liu, C.; Zou, B.; Rondinone, A. J.; Zhang, Z. J. Chemical control of superparamagnetic properties of magnesium and cobalt spinel ferrite nanoparticles through atomic level magnetic couplings. *Journal of the American Chemical Society*. **2000**, 122, 6263-6267.
- [61] Liu, C.; Rondinone Adam, J.; Zhang, Z. J. Synthesis of magnetic spinel ferrite  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles from ferric salt and characterization of the size-dependent superparamagnetic properties. In *Pure and Applied Chemistry*, 2000; pp 37.
- [62] Bercoff, P. G.; Bertorello, H. R. Exchange constants and transfer integrals of spinel ferrites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **1997**, 169, 314-322.
- [63] Golosovsky, I. V.; Tovar, M.; Hoffman, U.; Mirebeau, I.; Fauth, F.; Kurdyukov, D. A.; Kumzerov, Y. A. Diffraction studies of the crystalline and magnetic structures of  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  iron oxide nanostructured in porous glass. *Jetp Lett*. **2006**, 83, 298-301.
- [64] Yunus, S. M.; Yamauchi, H.; Zakaria, A. K. M.; Igawa, N.; Hoshikawa, A.; Ishii, Y. Magnetic structural characterization of Mg-Co-Cr ferrite by neutron diffraction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2007**, 310, 2722-2724.
- [65] Petric, A.; Ling, H. Electrical conductivity and thermal expansion of spinels at elevated temperatures. *Journal of the American Ceramic Society*. **2007**, 90, 1515-1520.



- [66] Sudimack, J.; Lee, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced drug delivery reviews*. **2000**, *41*, 147-162.
- [67] Zheng, X.;Kelley, K.;Elnakat, H.;Yan, W.;Dorn, T.; Ratnam, M. mRNA instability in the nucleus due to a novel open reading frame element is a major determinant of the narrow tissue specificity of folate receptor alpha. *Molecular and cellular biology*. **2003**, *23*, 2202-2212.
- [68] Saul, J. M.;Annapragada, A.;Natarajan, J. V.; Bellamkonda, R. V. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor in vitro. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. **2003**, *92*, 49-67.
- [69] Das, M.;Mishra, D.;Maiti, T. K.;Basak, A.; Pramanik, P. Bio-functionalization of magnetite nanoparticles using an aminophosphonic acid coupling agent: new, ultradispersed, iron-oxide folate nanoconjugates for cancer-specific targeting. *Nanotechnology*. **2008**, *19*, 415101.
- [70] Hayashi, K.;Moriya, M.;Sakamoto, W.; Yogo, T. Chemoselective synthesis of folic acid-functionalized magnetite nanoparticles via click chemistry for magnetic hyperthermia. *Chemistry of Materials*. **2009**, *21*, 1318-1325.
- [71] Sirotiak, F. M.; Tolner, B. Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Annual review of nutrition*. **1999**, *19*, 91-122.
- [72] Almadori, G.;Bussu, F.;Navarra, P.;Galli, J.;Paludetti, G.;Giardina, B.; Maurizi, M. Pilot phase IIA study for evaluation of the efficacy of folic acid in the treatment of laryngeal leucoplakia. *Cancer*. **2006**, *107*, 328-336.
- [73] Weitman, S. D.;Lark, R. H.;Coney, L. R.;Fort, D. W.;Frasca, V.;Zurawski, V. R., Jr.; Kamen, B. A. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer research*. **1992**, *52*, 3396-3401.
- [74] Antony, A. C. The biological chemistry of folate receptors. *Blood*. **1992**, *79*, 2807-2820.
- [75] Turek, J. J.;Leamon, C. P.; Low, P. S. Endocytosis of folate-protein conjugates: ultrastructural localization in KB cells. *Journal of cell science*. **1993**, *106* ( Pt 1), 423-430.
- [76] Kohler, N.;Fryxell, G. E.; Zhang, M. A bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents. *J Am Chem Soc*. **2004**, *126*, 7206-7211.
- [77] Chauhan, R. P.;Mathur, R.;Singh, G.;Kaul, A.;Bag, N.;Singh, S.;Kumar, H.;Patra, M.; Mishra, A. K. Evaluation of folate conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for scintigraphic/magnetic resonance imaging. *Journal of biomedical nanotechnology*. **2013**, *9*, 323-334.
- [78] Sonvico, F.;Mornet, S.;Vasseur, S.;Dubernet, C.;Jaillard, D.;Degrouard, J.;Hoebeke, J.;Duguet, E.;Colombo, P.; Couvreur, P. Folate-Conjugated iron oxide nanoparticles for solid tumor targeting as potential specific magnetic hyperthermia mediators: Synthesis, physicochemical characterization, and in vitro experiments. *Bioconjugate Chemistry*. **2005**, *16*, 1181-1188.



- [79] Soenen, S. J. H.; De Cuyper, M. Assessing iron oxide nanoparticle toxicity in vitro: current status and future prospects. *Nanomedicine*. **2010**, 5, 1261-1275.
- [80] Schrand, A. M.; Rahman, M. F.; Hussain, S. M.; Schlager, J. J.; Smith, D. A.; Syed, A. F. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. **2010**, 2, 544-568.
- [81] Rivera-Gil, P.; Jimenez De Aberasturi, D.; Wulf, V.; Pelaz, B.; Del Pino, P.; Zhao, Y.; De La Fuente, J. M.; Ruiz De Larramendi, I.; Rojo, T.; Liang, X.-J.; Parak, W. J. The challenge to relate the physicochemical properties of colloidal nanoparticles to their cytotoxicity. *Accounts of Chemical Research*. **2012**, 46, 743-749.
- [82] Martín, R.; Álvaro, M.; Herance, J. R.; García, H. Fenton-treated functionalized diamond nanoparticles as gene delivery system. *ACS Nano*. **2010**, 4, 65-74.
- [83] Nativo, P.; Prior, I. A.; Brust, M. Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. *ACS Nano*. **2008**, 2, 1639-1644.
- [84] Soenen, S. J.; Rivera-Gil, P.; Montenegro, J.-M.; Parak, W. J.; De Smedt, S. C.; Braeckmans, K. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today*. **2011**, 6, 446-465.
- [85] Nel, A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*. **2009**, 8, 543-557.
- [86] Nel, A.; Xia, T.; Mädler, L.; Li, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. **2006**, 311, 622-627.
- [87] Shemetov, A. A.; Nabiev, I.; Sukhanova, A. Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles. *ACS Nano*. **2012**, 6, 4585-4602.
- [88] Sharma, G.; Kodali, V.; Gaffrey, M.; Wang, W.; Minard, K. R.; Karin, N. J.; Teeguarden, J. G.; Thrall, B. D. Iron oxide nanoparticle agglomeration influences dose rates and modulates oxidative stress-mediated dose-response profiles in vitro. *Nanotoxicology*. **2014**, 8, 663-675.
- [89] Sharma, G.; Kodali, V.; Gaffrey, M.; Wang, W.; Minard, K. R.; Karin, N. J.; Teeguarden, J. G.; Thrall, B. D. Iron oxide nanoparticle agglomeration influences dose rates and modulates oxidative stress-mediated dose-response profiles in vitro. *Nanotoxicology*. **2014**, 8, 663-675.
- [90] Soenen, S. J.; Brisson, A. R.; De Cuyper, M. Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: the magnetoliposome model. *Biomaterials*. **2009**, 30, 3691-3701.
- [91] Soenen, S. J.; De Meyer, S. F.; Dresselaers, T.; Velde, G. V.; Pareyn, I. M.; Braeckmans, K.; De Cuyper, M.; Himmelreich, U.; Vanhoorelbeke, K. I. MRI assessment of blood outgrowth endothelial cell homing using cationic magnetoliposomes. *Biomaterials*. **2011**, 32, 4140-4150.

- [92] Soenen, S. J.;Brisson, A. R.;Jonckheere, E.;Nuytten, N.;Tan, S.;Himmelreich, U.; De Cuyper, M. The labeling of cationic iron oxide nanoparticle-resistant hepatocellular carcinoma cells using targeted magnetoliposomes. *Biomaterials*. **2011**, *32*, 1748-1758.
- [93] Osborne, E. A.;Atkins, T. M.;Gilbert, D. A.;Kauzlarich, S. M.;Liu, K.; Louie, A. Y. Rapid microwave-assisted synthesis of dextran-coated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Nanotechnology*. **2012**, *23*, 215602.
- [94] Berry, C. C.;Wells, S.;Charles, S.; Curtis, A. S. G. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. **2003**, *24*, 4551-4557.
- [95] de la Fuente, J. M.;Alcantara, D.; Penades, S. Cell response to magnetic glyconanoparticles: does the carbohydrate matter? *IEEE transactions on nanobioscience*. **2007**, *6*, 275-281.
- [96] Colognato, R.;Bonelli, A.;Bonacchi, D.;Baldi, G.; Migliore, L. Analysis of cobalt ferrite nanoparticles induced genotoxicity on human peripheral lymphocytes: comparison of size and organic grafting-dependent effects. *Nanotoxicology*. **2007**, *1*, 301-308.
- [97] Kim, J. S.;Yoon, T.-J.;Yu, K. N.;Kim, B. G.;Park, S. J.;Kim, H. W.;Lee, K. H.;Park, S. B.;Lee, J.-K.; Cho, M. H. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicological Sciences*. **2006**, *89*, 338-347.
- [98] Bregar, V. B.;Lojk, J.;Šuštar, V.;Veranič, P.; Pavlin, M. Visualization of internalization of functionalized cobalt ferrite nanoparticles and their intracellular fate. *International journal of nanomedicine*. **2013**, *8*, 919.
- [99] Di Guglielmo, C.;Lopez, D. R.;De Lapuente, J.;Mallafre, J. M.; Suarez, M. B. Embryotoxicity of cobalt ferrite and gold nanoparticles: a first in vitro approach. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*. **2010**, *30*, 271-276.
- [100] Horev-Azaria, L.;Baldi, G.;Beno, D.;Bonacchi, D.;Golla-Schindler, U.;Kirkpatrick, J. C.;Kolle, S.;Landsiedel, R.;Maimon, O.;Marche, P. N.;Ponti, J.;Romano, R.;Rossi, F.;Sommer, D.;Uboldi, C.;Unger, R. E.;Villiers, C.; Korenstein, R. Predictive toxicology of cobalt ferrite nanoparticles: comparative in-vitro study of different cellular models using methods of knowledge discovery from data. *Particle and Fibre Toxicology*. **2013**, *10*, 32-32.
- [101] Brunner, T. J.;Wick, P.;Manser, P.;Spohn, P.;Grass, R. N.;Limbach, L. K.;Bruinink, A.; Stark, W. J. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental Science & Technology*. **2006**, *40*, 4374-4381.
- [102] Diaz, B.;Sanchez-Espinel, C.;Arruebo, M.;Faro, J.;de Miguel, E.;Magadan, S.;Yague, C.;Fernandez-Pacheco, R.;Ibarra, M. R.;Santamaria, J.; Gonzalez-Fernandez, A. Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. **2008**, *4*, 2025-2034.

- [103] Soenen, S. J. H.;Himmelreich, U.;Nuytten, N.;Pisanic, T. R.;Ferrari, A.; De Cuyper, M. Intracellular nanoparticle coating stability determines nanoparticle diagnostics efficacy and cell functionality. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. **2010**, *6*, 2136-2145.
- [104] Arvizo, R. R.;Miranda, O. R.;Thompson, M. A.;Pabelick, C. M.;Bhattacharya, R.;Robertson, J. D.;Rotello, V. M.;Prakash, Y. S.; Mukherjee, P. Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. *Nano Letters*. **2010**, *10*, 2543-2548.
- [105] Zhang, L. W.; Monteiro-Riviere, N. A. Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. **2009**, *110*, 138-155.
- [106] Soenen, S. J. H.;Illyes, E.;Vercauteren, D.;Braeckmans, K.;Majer, Z.;De Smedt, S. C.; De Cuyper, M. The role of nanoparticle concentration-dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes. *Biomaterials*. **2009**, *30*, 6803-6813.
- [107] Smith, C.-A. M.;Fuente, J. d. l.;Pelaz, B.;Furlani, E. P.;Mullin, M.; Berry, C. C. The effect of static magnetic fields and tat peptides on cellular and nuclear uptake of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*. **2010**, *31*, 4392-4400.
- [108] Corot, C.;Robert, P.;Idée, J.-M.; Port, M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Advanced drug delivery reviews*. **2006**, *58*, 1471-1504.
- [109] Lee, J.-H.;Huh, Y.-M.;Jun, Y.-w.;Seo, J.-w.;Jang, J.-t.;Song, H.-T.;Kim, S.;Cho, E.-J.;Yoon, H.-G.;Suh, J.-S.; Cheon, J. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 95-99.
- [110] Schultz-Sikma, E. A.;Joshi, H. M.;Ma, Q.;MacRenaris, K. W.;Eckermann, A. L.;Dravid, V. P.; Meade, T. J. Probing the chemical stability of mixed ferrites: Implications for magnetic resonance contrast agent design. *Chemistry of Materials*. **2011**, *23*, 2657-2664.
- [111] Joshi, H. M.;Lin, Y. P.;Aslam, M.;Prasad, P. V.;Schultz-Sikma, E. A.;Edelman, R.;Meade, T.; Dravid, V. P. Effects of shape and size of cobalt ferrite nanostructures on their MRI contrast and thermal activation. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2009**, *113*, 17761-17767.
- [112] Venkatesha, N.;Srivastava, C.; Hegde, V. Synergetic effect of size and morphology of cobalt ferrite nanoparticles on proton relaxivity. *IET Nanobiotechnology*. **2014**, *8*, 184-189.
- [113] Liu, F.;Laurent, S.;Roch, A.;Elst, L. V.; Muller, R. N. Size-controlled synthesis of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles potential contrast agent for MRI and investigation on their size-dependent magnetic properties. *Journal of Nanomaterials*. **2013**, *2013*, 127.
- [114] Jiang, Q. L.;Zheng, S. W.;Hong, R. Y.;Deng, S. M.;Guo, L.;Hu, R. L.;Gao, B.;Huang, M.;Cheng, L. F.;Liu, G. H.; Wang, Y. Q. Folic acid-conjugated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for hyperthermia and MRI in vitro and in vivo. *Applied Surface Science*. **2014**, *307*, 224-233.

- [115] Park, B. J.;Choi, K.-H.;Nam, K. C.;Ali, A.;Min, J. E.;Son, H.;Uhm, H. S.;Kim, H.-J.;Jung, J.-S.; Choi, E. H. Photodynamic anticancer activities of multifunctional cobalt ferrite nanoparticles in various cancer cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. **2015**, *11*, 226-235.
- [116] Leamon, C. P.; Reddy, J. A. Folate-targeted chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*. **2004**, *56*, 1127-1141.
- [117] Mahajan, S.;Koul, V.;Choudhary, V.;Shishodia, G.; Bharti, A. C. Preparation and in vitro evaluation of folate-receptor-targeted SPION-polymer micelle hybrids for MRI contrast enhancement in cancer imaging. *Nanotechnology*. **2013**, *24*, 015603.
- [118] Bhattacharya, D.;Das, M.;Mishra, D.;Banerjee, I.;Sahu, S. K.;Maiti, T. K.; Pramanik, P. Folate receptor targeted, carboxymethyl chitosan functionalized iron oxide nanoparticles: a novel ultradispersed nanoconjugates for bimodal imaging. *Nanoscale*. **2011**, *3*, 1653-1662.
- [119] Hergt, R.;Hiergeist, R.;Zeisberger, M.;Glöckl, G.;Weitschies, W.;Ramirez, L. P.;Hilger, I.; Kaiser, W. A. Enhancement of AC-losses of magnetic nanoparticles for heating applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2004**, *280*, 358-368.
- [120] Mehdaoui, B.;Carrey, J.;Stadler, M.;Cornejo, A.;Nayral, C.;Delpech, F.;Chaudret, B.; Respaud, M. Influence of a transverse static magnetic field on the magnetic hyperthermia properties and high-frequency hysteresis loops of ferromagnetic FeCo nanoparticles. *Applied Physics Letters*. **2012**, *100*, -.
- [121] Carrey, J.;Mehdaoui, B.; Respaud, M. Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization. *Journal of Applied Physics*. **2011**, *109*, -.
- [122] Mazario, E.;Menéndez, N.;Herrasti, P.;Cañete, M.;Connord, V.; Carrey, J. Magnetic hyperthermia properties of electrosynthesized cobalt ferrite nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*. **2013**, *117*, 11405-11411.
- [123] Fantechi, E.;Innocenti, C.;Albino, M.;Lottini, E.; Sangregorio, C. Influence of cobalt doping on the hyperthermic efficiency of magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2015**, *380*, 365-371.
- [124] Bala, T.;Sankar, C. R.;Baidakova, M.;Osipov, V.;Enoki, T.;Joy, P. A.;Prasad, B. L.; Sastry, M. Cobalt and magnesium ferrite nanoparticles: preparation using liquid foams as templates and their magnetic characteristics. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. **2005**, *21*, 10638-10643.
- [125] Peddis, D.;Orrù, F.;Ardu, A.;Cannas, C.;Musinu, A.; Piccaluga, G. Interparticle interactions and magnetic anisotropy in cobalt ferrite nanoparticles: Influence of molecular coating. *Chemistry of Materials*. **2012**, *24*, 1062-1071.

- [126] Hergt, R.;Andra, W.;d'Ambly, C. G.;Hilger, I.;Kaiser, W. A.;Richter, U.; Schmidt, H.-G. Physical limits of hyperthermia using magnetite fine particles. *Magnetics, IEEE Transactions on*. **1998**, *34*, 3745-3754.
- [127] Fortin, J.-P.;Wilhelm, C.;Servais, J.;Ménager, C.;Bacri, J.-C.; Gazeau, F. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *Journal of the American Chemical Society*. **2007**, *129*, 2628-2635.
- [128] Fortin, J.-P.;Gazeau, F.; Wilhelm, C. Intracellular heating of living cells through Néel relaxation of magnetic nanoparticles. *Eur Biophys J*. **2008**, *37*, 223-228.
- [129] Lima, E., Jr.;De Biasi, E.;Zysler, R.;Vasquez Mansilla, M.;Mojica-Pisciotti, M.;Torres, T.;Calatayud, M. P.;Marquina, C.;Ricardo Ibarra, M.; Goya, G. Relaxation time diagram for identifying heat generation mechanisms in magnetic fluid hyperthermia. *J Nanopart Res*. **2014**, *16*, 1-11.
- [130] Usov, N.; Liubimov, B. Y. Dynamics of magnetic nanoparticle in a viscous liquid: Application to magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Applied Physics*. **2012**, *112*, 023901.
- [131] Brezovich, I. A low frequency hyperthermia capacitive and ferromagnetic thermoseed methods. *Med. Phys. Monograph*. **1988**, *16*, 82-111.
- [132] Hergt, R.; Dutz, S. Magnetic particle hyperthermia—biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2007**, *311*, 187-192.
- [133] Kallumadil, M.;Tada, M.;Nakagawa, T.;Abe, M.;Southern, P.; Pankhurst, Q. A. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2009**, *321*, 1509-1513.
- [134] Di Corato, R.;Espinosa, A.;Lartigue, L.;Tharaud, M.;Chat, S.;Pellegrino, T.;Ménager, C.;Gazeau, F.; Wilhelm, C. Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials*. **2014**, *35*, 6400-6411.
- [135] Andreu, I.;Natividad, E.;Ravagli, C.;Castro, M.; Baldi, G. Heating ability of cobalt ferrite nanoparticles showing dynamic and interaction effects. *RSC Advances*. **2014**, *4*, 28968-28977.
- [136] Verde, E.;Landi, G.;Gomes, J.;Sousa, M.; Bakuzis, A. Magnetic hyperthermia investigation of cobalt ferrite nanoparticles: Comparison between experiment, linear response theory, and dynamic hysteresis simulations. *Journal of Applied Physics*. **2012**, *111*, 123902.
- [137] Kita, E.;Hashimoto, S.;Kayano, T.;Minagawa, M.;Yanagihara, H.;Kishimoto, M.;Yamada, K.;Oda, T.;Ohkohchi, N.; Takagi, T. Heating characteristics of ferromagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Journal of Applied Physics*. **2010**, *107*, 09B321.
- [138] Surendra, M. K.;Dutta, R.; Rao, M. R. Realization of highest specific absorption rate near superparamagnetic limit of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  colloids for magnetic hyperthermia applications. *Materials Research Express*. **2014**, *1*, 026107.

- [139] Durneata, D.; Hempelmann, R.; Caltun, O.; Dumitru, I. High-frequency specific absorption rate of  $\text{Co}_x\text{Fe}_{1-x}\text{Fe}_2\text{O}_4$  ferrite nanoparticles for hyperthermia applications. *Magnetics, IEEE Transactions on*. **2014**, *50*, 1-4.
- [140] Psimadas, D.; Baldi, G.; Ravagli, C.; Franchini, M. C.; Locatelli, E.; Innocenti, C.; Sangregorio, C.; Loudos, G. Comparison of the magnetic, radiolabeling, hyperthermic and biodistribution properties of hybrid nanoparticles bearing  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  metal cores. *Nanotechnology*. **2014**, *25*, 025101.
- [141] Kim, D.-H.; Lee, S.-H.; Kim, K.-N.; Kim, K.-M.; Shim, I.-B.; Lee, Y.-K. Temperature change of various ferrite particles with alternating magnetic field for hyperthermic application. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. **2005**, *293*, 320-327.
- [142] Veverka, M.; Veverka, P.; Kaman, O.; Pollert, E.; Duguet, E.; Vasseur, S. Magnetic heating by cobalt ferrite nanoparticles. *Nanotechnology*. **2007**, *18*, 345704.
- [143] Sabale, S.; Jadhav, V.; Khot, V.; Zhu, X.; Xin, M.; Chen, H. Superparamagnetic  $\text{MFe}_2\text{O}_4$  (M = Ni, Co, Zn, Mn) nanoparticles: synthesis, characterization, induction heating and cell viability studies for cancer hyperthermia applications. *J Mater Sci: Mater Med*. **2015**, *26*, 1-9.
- [144] Pradhan, P.; Giri, J.; Samanta, G.; Sarma, H. D.; Mishra, K. P.; Bellare, J.; Banerjee, R.; Bahadur, D. Comparative evaluation of heating ability and biocompatibility of different ferrite-based magnetic fluids for hyperthermia application. *Journal of biomedical materials research Part B: Applied Biomaterials*. **2007**, *81*, 12-22.
- [145] Torres, T.; Roca, A.; Morales, M.; Ibarra, A.; Marquina, C.; Ibarra, M.; Goya, G. Magnetic properties and energy absorption of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanoparticles for magnetic hyperthermia. In *Journal of Physics: Conference Series*; IOP Publishing, 2010; pp 072101.
- [146] Verde, E. L.; Landi, G. T.; Carrião, M. S.; Drummond, A. L.; Gomes, J. A.; Vieira, E. D.; Sousa, M. H.; Bakuzis, A. F. Field dependent transition to the non-linear regime in magnetic hyperthermia experiments: Comparison between maghemite, copper, zinc, nickel and cobalt ferrite nanoparticles of similar sizes. *AIP Advances*. **2012**, *2*, 032120.



# Chapter 5

## CONCLUSIONS





The main conclusions of this thesis could be summarized as follows:

A new method has been developed to obtain stoichiometric cobalt ferrite nanoparticles based on electrochemistry. Different parameters related with the synthesis have been optimized to obtain stoichiometric cobalt ferrite of different sizes. The most important parameters investigated included synthesis temperature, magnetic stirring of the solution, current applied to each electrode and the position of them inside the cell. This method is inexpensive, easy to perform and reproducible. With the optimization of these parameters it is possible to obtain stoichiometric NPs with average sizes of 22, 36, and 56 nm. The latter has large polydispersity and it is in the magnetic multidomain region whereas the former are monodomain and with monodisperse sizes.

After the synthesis process, the functionalization of the stoichiometric samples synthesized at 25 °C (22 nm) and 60 °C (36 nm) with citric acid has been done in order to achieve three main objectives. Firstly, the reduction of the particle size dispersity by the dissolution of the bigger ones (sample synthesized at 25 °C – 18 nm and sample synthesized at 60 °C – 32 nm). Secondly, the functionalization of the nanoparticle surface to obtain a stable colloid with negative surface charge and moderate hydrodynamic size value. Finally, this process serves as a cleaning process where secondary phases are eliminated.

An exhaustive characterization of the synthesized nanoparticles was performed in order to obtain the structural and magnetic information of the stoichiometric samples synthesized at 25 °C and 60 °C and functionalized with citric acid. First of all, the exclusive presence of  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  in the spinel structure by means of XANES spectroscopy has been demonstrated. The same inversion degree of this compound was found by ND and Mössbauer spectroscopy with the value of  $\gamma=0.72$  and the stoichiometric formula was found to be  $(\text{Co}_{0.27}\text{Fe}_{0.73})[\text{Co}_{0.36}\text{Fe}_{0.64}]_2\text{O}_4$ . Neutron diffraction was also useful to calculate the magnetic moment of each position, A and B in the spinel structure, with these values the net magnetization moment was calculated as  $2.4 \mu_B$  per unit formula. The evolution of this net magnetic moment with temperature was measured to obtain the Néel temperature and it was found at 800 K by ND. The  $T_N$  was also measured by Mössbauer spectroscopy and it was found at 860 K when the magnetic split structure disappeared.

Another strategy of functionalization has been done with the stoichiometric sample synthesized at 25 °C. It consisted of the vectorization of the surface of the nanoparticles with a biomolecule such as the vitamin B, folic acid. This molecule is a vectorization molecule, with high specificity for cancer cells with overexpress folate receptors. An accurate colloidal characterization was carried out by means of TGA, FTIR, Zeta potential and DLS to confirm the surface functionalization. Remarkably, the folic acid functionalized nanoparticles have a highly negative zeta potential, below -20 mV at pH 7.2 and the hydrodynamic size was less than 100 nm.

The stoichiometric cobalt ferrite nanoparticles synthesized at 25 °C and functionalized with citric acid or folic acid do not show cytotoxic effects, at least in a concentration range between 0-0.25 mg NPs/ml, and no cytoskeleton alterations were observed.

The specificity of the folic acid functionalized nanoparticles were compared with the citric acid functionalized nanoparticles. For this purpose, the cellular line HeLa, which has folate receptors in the cells surface, was used. Qualitatively, it was possible to confirm that both colloidal suspensions can be internalized into the HeLa cells by means of optical imaging. However quantitatively, the amount of iron was measured inside the cells, and this value was four times higher for folic acid functionalized nanoparticles than citric acid functionalized nanoparticles, confirming a higher internalization rate.

The cobalt ferrite nanoparticles have a good response in magnetic resonance image. The faster relaxation process is the transversal one ( $T_2$ ), with a relaxivity ( $r_2$ ) value of  $390 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . The higher phantom image contrast obtained with HeLa cells and NPs functionalized with FA compared to the phantom image contrast obtained with A-549 cells (no folate receptors), and the same NPs, also confirms the vectorization towards cells with folate receptors.

The brownian relaxation process has dominated the heating mechanism of the cobalt ferrite nanoparticles, because the high magnetic anisotropy constant of these samples inhibits the orientation of the magnetic moment along the magnetic field applied. So, these cobalt ferrites are not good candidates to be used in hyperthermia therapies.

# Chapter 6

## PUBLICATIONS



## Other publications

- 1) Autores** (p. o. de firma): E. Mazarío, L. Cabrera, P. Herrasti  
**Título:** Corrosion inhibition of aluminium by deposition of polypyrrole and silane compounds  
**Revista:** Advances in Engineering Science (SCI)                      Clave: A  
**Volumen:** 1              Páginas, inicial: 37      final: 44  
**Fecha:** Dic 2007
- 2) Autores** (p. o. de firma): M.C.Alonso, M. Sánchez, E. Mazarío, F.J. Recio, H. Mahmoud, R. Hingorani  
**Título:** High strength stainless steel 14301 for prestressed concrete structures protection.  
**Libro:** 2010 Taylor & Francis Group, London, ISBN 978-0-415-59316-8.X      Clave: CL  
**Volumen:** 2              Páginas, inicial: 1047      final: 1054  
**Fecha:** Junio 2010  
Lugar de publicación: México
- 3) Autores** (p. o. de firma): R. Galindo, E. Mazarío, S. Gutierrez, M.P Morales, P. Herrasti  
**Título:** Electrochemical synthesis of NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Characterization and their catalytic applications.  
**Revista:** Journal of Alloys and Compounds.                      Clave: A  
**Volumen:** 536(s 1)              Páginas, inicial: S241      final: S244  
**Fecha:** Septiembre 2012
- 4) Autores** (p. o. de firma): D. Reyman, M. Viñas, G. Tardajos, E. Mazarío  
**Título:** The impact of dihydrogen phosphate anions on the excited-state proton transfer of harmane. Effect of beta-cyclodextrin on these photoreactions.  
**Revista:** The Journal of physical chemistry A Clave: A  
**Volumen:** 1              Páginas, inicial: 207      final: 214  
**Fecha:** 12 enero 2012
- 5) Autores** (p. o. de firma): E. Mazario, J. Sánchez-Marcos, N. Menéndez, P. Herrasti, M. García-Hernández, A. Muñoz-Bonilla.  
**Título:** One-pot electrochemical synthesis of polydopamine coated magnetite nanoparticles  
**Revista:** RSC Advances                      Clave: A  
**Volumen:** 4              Páginas, inicial: 48353 final: 48361  
**Fecha:** Agosto 2014
- 6) Autores** (p. o. de firma): I. Lozano, E. Mazario, C.O Olivares-Xometl, NV. Likhanova, P. Herrasti.  
**Título:** Corrosion behaviour of API 5LX52 steel in HCl and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> media in the presence of 1,3-dibencilimidazolium acetate and 1,3-dibencilimidazolium dodecanoate ionic liquids as inhibitors  
**Revista:** Materials Chemistry and Physics                      Clave: A  
**Volumen:** 147              Páginas, inicial: 191      final: 197  
**Fecha:** Septiembre 2014

- 7) **Autores** (p. o. de firma): V. Velasco, L. Muñoz, E. Mazario, N. Menéndez, P. Herrasti, A. Hernando, P. Crespo.  
**Título:** Chemically synthesized Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanostructures with controlled optical and magnetic properties.  
**Revista:** Journal of Physics D: Applied Physics Clave: A  
**Volumen:** 48 Páginas, inicial: 035502  
**Fecha:** Enero 2015
- 8) **Autores** (p. o. de firma): E. Mazario, J. Sánchez-Marcos, N. Menéndez, M. Canete, A. Mayoral, S. Rivera-Fernández, J.M. de la Fuente, P. Herrasti.  
**Título:** High Specific Absorption Rate and Transverse Relaxivity Effects in Manganese Ferrite Nanoparticles Obtained by an Electrochemical Route.  
**Revista:** Journal of Physical Chemistry C Clave: A  
**Volumen:** 119 Páginas, inicial: 6828 final: 6834  
**Fecha:** Enero 2015
- 9) **Autores** (p. o. de firma): A. S. de Leon, J. Rodriguez-Hernandez, E. Mazario, J. Sánchez-Marcos, N. Menéndez, P. Herrasti, A. Muñoz-Bonilla.  
**Título:** Design of hybrid gradient porous surfaces with magnetic nanoparticles  
**Revista:** Polymer Clave: A  
**Volumen:** Páginas, inicial: final:  
**Fecha:** en revisión, POLYMER-15-577
- 10) **Autores** (p. o. de firma): J. Jaime, E. Mazario, N. Menendez, J. Sanchez, A. Muñoz-Bonilla, P. Herrasti  
**Título:** Comparation of ferrites nanoparticles obtained electrochemically for catalytical reduction of hydrogen peroxide  
**Revista:** Journal of Solid State Electrochemistry Clave: A  
**Volumen:** Páginas, inicial: final:  
**Fecha:** en revisión
- 11) **Autores** (p. o. de firma): L. J. Martínez, A. Muñoz-Bonilla, E. Mazario, F.J. Recio, F.J. Palomares, P. Herrasti.  
**Título:** Adsorption of chromium (VI) onto magnetite nanoparticles obtained electrochemically  
**Revista:** International Journal of Environmental Science and Technology  
Clave: A  
**Volumen:** Páginas, inicial: final:  
**Fecha:** en revisión, JEST-D-15-00004

